

**ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITA' DI BOLOGNA**  
**SEDE DI BOLOGNA**

**DOTTORATO IN BIOLOGIA FUNZIONALE DEI SISTEMI**  
**CELLULARI E MOLECOLARI**

**SETTORE DISCIPLINARE BIO 11**

Materia di Tesi: Biologia Molecolare

**LOCALIZZAZIONE DELLA TOPOISOMERASI IB**  
**SUI TELOMERI DI *S. CEREVISIAE* E RUOLO**  
**DELLA SUA ATTIVITA' CATALITICA SULLE**  
**MODIFICAZIONI ISTONICHE**

Tesi di Dottorato di:

Alessandra Russo

Relatore:

Chiar.mo Prof. Giovanni Capranico

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Vincenzo Scarlato

Anno Accademico 2006/07



## INDICE

<b>RIASSUNTO</b>	<b>4</b>
<b>CAPITOLO 1. INTRODUZIONE</b>	<b>6</b>
<b>1.1. Il problema topologico</b>	<b>7</b>
<b>1.2. Le DNA Topoisomerasi</b>	<b>15</b>
<b>1.3. Inibitori e veleni delle DNA Topoisomerasi</b>	<b>27</b>
<b>1.4. Ruolo delle DNA topoisomerasi nei processi cellulari</b>	<b>32</b>
<b>1.5. Topoisomerasi I e la cromatina silente in <i>S. cerevisiae</i></b>	<b>39</b>
<b>SCOPO DELLA RICERCA DI TESI</b>	<b>45</b>
<b>CAPITOLO 2. MATERIALI E METODI</b>	<b>46</b>
<b>CAPITOLO 3. RISULTATI</b>	<b>82</b>
<b>3.1 Costruzione di plasmidi per l'espressione di DNA Topoisomerasi I in lievito</b>	<b>83</b>
<b>3.2. Caratterizzazione del ceppo di lievito JEL1<math>\Delta</math>top1</b>	<b>96</b>
<b>3.3. Analisi dei profili di espressione influenzati da Top1 in cellule di <i>S. cerevisiae</i> in fase esponenziale di crescita</b>	<b>104</b>
<b>3.4. Top1 si localizza ed è cataliticamente attiva nelle ripetizioni telomeriche in cellule di <i>S. cerevisiae</i></b>	<b>118</b>
<b>3.5. Top1 influenza le modificazioni istoniche ed il reclutamento di Sir3 nel telomero destro del cromosoma XIV in cellule di <i>S.cerevisiae</i> in fase esponenziale di crescita</b>	<b>124</b>
<b>3.6. Ruolo di Top1 su un gene reporter telomerico</b>	<b>136</b>
<b>CAPITOLO 4. DISCUSSIONE</b>	<b>143</b>
<b>APPENDICE</b>	<b>150</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>177</b>

# RIASSUNTO

---

Il superavvolgimento del DNA nelle cellule, regolato dalle DNA Topoisomerasi, influenza molti processi biologici, quali la trascrizione, la replicazione, la ricombinazione ed il rimodellamento della cromatina. La DNA Topoisomerasi IB eucariotica, (Top1), è un enzima efficiente nella rimozione dei superavvolgimenti del DNA *in vitro* e la sua principale funzione cellulare è la rimozione dei superavvolgimenti positivi e negativi generati durante la trascrizione e la replicazione.

Risultati recenti hanno fornito evidenze sperimentali del coinvolgimento di Top1 in meccanismi multipli di regolazione dell'espressione genica eucariotica, in particolare nella fase di inizio e maturazione dei trascritti. Tuttavia, le funzioni di Top1 non sono ancora state stabilite a livello globale. Pertanto, nella presente tesi di dottorato abbiamo risposto a questa domanda con l'analisi dei profili di trascrizione genica globale e con studi di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) in cellule di *S. cerevisiae*.

Circa il 9% dei geni sono influenzati da Top1, e l'analisi dei profili di espressione mostra che Top1 wt aumenta l'utilizzo del glucosio e dei pathway per la produzione di energia, con specifica diminuzione della trascrizione dei geni telomerici e sub-telomerici. Abbiamo inoltre dimostrato che Top1 wt, ma non il suo mutante inattivo, aumenta la velocità di crescita cellulare nelle cellule di lievito studiate. Le analisi di ChIP mostrano che, in confronto all'assenza dell'enzima, Top1 wt diminuisce l'acetilazione dell'istone H4, compresa quella specifica della lisina 16, nel telomero destro del cromosoma XIV mentre la mutazione che inattiva l'enzima aumenta in maniera marcata l'acetilazione dell'istone H4 e la di-metilazione della lisina 4 dell'istone H3. Top1 wt incrementa anche il reclutamento di Sir3 nelle regioni di confine della cromatina silenziata dello stesso telomero. Studi di immunoprecipitazione indicano che l'enzima interagisce direttamente con la struttura della cromatina telomerica poichè entrambe le proteine, quella wt e quella inattiva, sono localizzate sulle ripetizioni telomeriche dei cromosomi di lievito.

Questi risultati dimostrano che Top1, una proteina non essenziale in lievito, ottimizza i livelli globali dei trascritti per una crescita più efficiente di cellule in fase esponenziale. Indagando il meccanismo che è alla base della specifica repressione dei geni telomerici, abbiamo dimostrato che Top1 favorisce delle modifiche post-traduzionali degli istoni che indicano una struttura della cromatina repressa nelle regioni telomeriche.

## Capitolo 1

# INTRODUZIONE

---

## 1.1. Il problema topologico

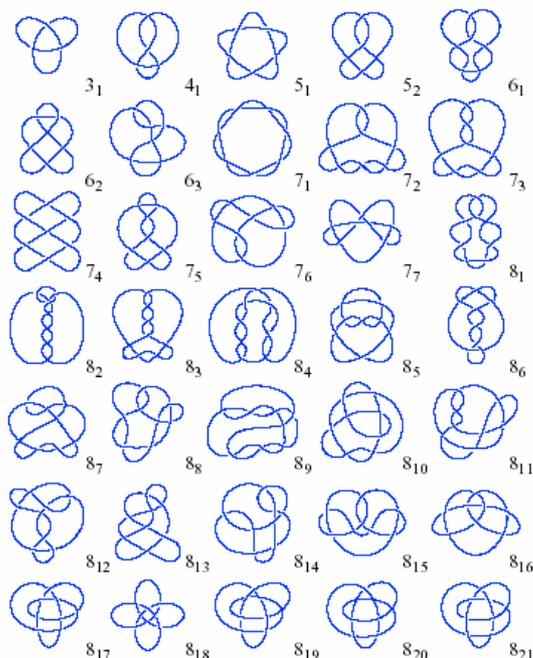
### 1.1.1. La cellula e la topologia del DNA

Nel 1963 Dulbecco e Vogt scoprirono che il DNA del poliomavirus esisteva in una forma circolare chiusa. In questa forma, i due filamenti che danno origine alla doppia elica, oltre che essere strettamente associati perché complementari, sono chiusi su loro stessi: questa è la forma prevalente in cui il DNA è funzionale all'interno della cellula (1). Altri DNA circolari furono scoperti in un crescente numero di organismi; per un certo numero di fagi ( $\lambda$ ,  $\phi$ X174, fd) fu scoperto che le molecole di DNA, che sono presenti nelle particelle fagiche in una forma diversa, adottano la forma circolare chiusa quando inserite e funzionali all'interno della cellula come nel caso del batteriofago  $\lambda$ , in cui, quando il DNA è all'interno del batteriofago, si presenta in una forma lineare con le estremità coesive, ma diventa circolare spontaneamente in soluzione o all'interno del batterio quando il  $\lambda$  DNA è iniettato nella cellula. La forma circolare chiusa è, dunque, caratteristica del DNA batterico.

Nella metà degli anni 70, si scoprì che anche le molecole di DNA più grandi, caratteristiche delle cellule superiori, formano strutture a loop, tenute insieme da complessi proteici, in cui ciascun loop ha caratteristiche topologiche analoghe alle molecole di DNA circolare chiuso. Gradualmente divenne chiaro che la struttura del DNA circolare chiuso ed il superavvolgimento ad esso associato giocassero un ruolo estremamente importante negli organismi viventi.

Durante il processo di trasformazione del DNA lineare in un circolo chiuso, la molecola che ne risulta può mostrare di non essere annodata o di essere annodata in modi diversi (Figura 1; 2). La probabilità di annodarsi dipende dalla lunghezza e dal diametro effettivo del DNA. Il diametro effettivo del DNA può essere significativamente maggiore del suo diametro geometrico a causa della repulsione elettrostatica tra due segmenti di DNA in avvicinamento, ciascuno dei quali è fortemente carico negativamente. Questa repulsione elettrostatica è schermata da piccoli ioni positivi presenti in soluzione o all'interno della cellula (di solito ioni sodio). Tanto maggiore sarà la concentrazione degli ioni sodio, tanto più il diametro effettivo si avvicinerà al suo valore minimo geometrico. La probabilità di annodamento del DNA è stata calcolata accuratamente (3, 4) e questi calcoli sono stati pienamente confermati da

misure sperimentali della frazione di DNA annodato in soluzioni a diverse concentrazioni di sodio (5).



**Figura 1. Rappresentazione dei possibili nodi che si possono formare quando una molecola di DNA lineare assume una struttura circolare in maniera casuale. La prima cifra indica il numero di incroci, la seconda (il pedice) il numero di nodi per ogni molecola.**

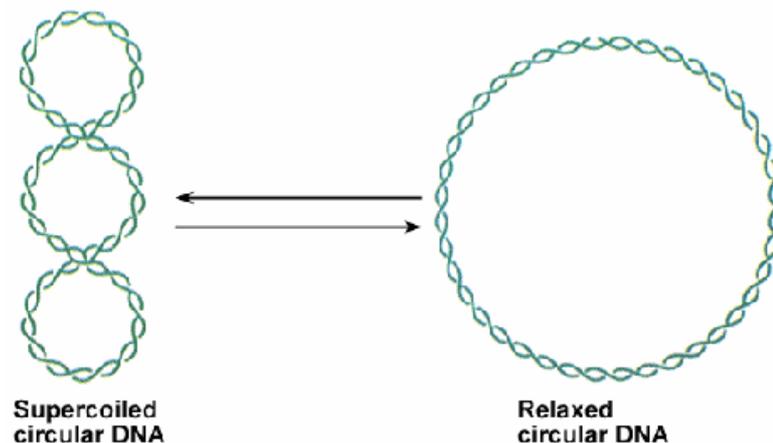
Poichè la trasformazione del DNA lineare in un circolo chiuso avviene in caso di infezione da parte di alcuni batteriofagi (non solo nel caso del batteriofago  $\lambda$ ), la probabilità consistente, prevista teoricamente, di formazione di nodi, ha suggerito che deve esistere un particolare meccanismo in grado di intervenire nella topologia del DNA (3).

In termini fisici, la caratteristica distintiva delle molecole circolari chiuse, in confronto con il DNA lineare, è che una volta che i filamenti complementari si richiudono in un circolo, la molecola assume uno stato topologico che non può essere alterato da nessun riarrangiamento conformazionale, a meno di un taglio nei filamenti stessi: nel 1969 James Wang scoprì la DNA topoisomerasi I batterica, un enzima capace di controllare il livello del superavvolgimento del DNA (6).

### 1.1.2. Superavvolgimento del DNA

Data una doppia elica di DNA, in cui i due filamenti complementari sono associati in una molecola circolare chiusa, l'asse della doppia elica può formare un'elica di ordine superiore (figura 2). Questa deformazione dell'asse dell'elica è chiamata superavvolgimento, e il numero di volte che un filamento si avvolge intorno all'altro si chiama numero di legame, indicato con  $L_k$  (linking number).

Il parametro  $L_k$  è una costante topologica che non può essere cambiata con alcuna deformazione dei filamenti di DNA senza la rottura dei medesimi. Il valore di  $L_k$  si può facilmente calcolare dal numero di volte che un filamento passa attraverso la superficie sulla quale è posto l'altro filamento quando il DNA è posto su un piano e non presenta superavvolgimenti.



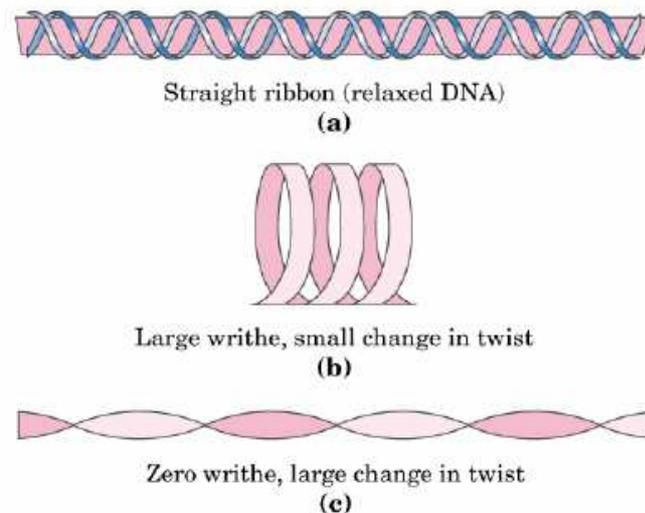
**Figura 2. Due filamenti complementari di DNA circolare chiuso (a destra) formano intersezioni di ordine superiore (a sinistra)**

Per convenzione, il  $L_k$  è considerato positivo per ogni giro a destra della doppia elica; in ogni caso si tratta di un numero intero definito da due componenti: il “twisting number” ed il “writhing number” secondo l’equazione:  $L_k = W + T$ .

Il Twisting number,  $T$ , è una proprietà della doppia elica stessa perché rappresenta il numero totale di giri del duplex, determinati dal numero di paia di basi per giro. Per una molecola rilassata che sta su una superficie piana, il twist è il numero totale di paia di basi diviso il numero di paia di basi per giro.

Il Writhing number,  $W$ , rappresenta la rotazione dell'asse del duplex nello spazio, corrispondendo al concetto intuitivo di superavvolgimento, senza però avere lo stesso significato quantitativo. Per molecole rilassate,  $W=0$  e  $L_k=T$  (figura 3).

Molecole di DNA di sequenza identica possono avere  $L_k$  diverso e presentare vari superavvolgimenti. Tali molecole sono chiamate isomeri topologici (7).



**Figura 3. Modello nastriforme per illustrare Writhe e Twist. (a) molecola di DNA rilassata; (b) molecola di DNA con  $W$  alto e  $T$  basso; (c) molecola di DNA con  $W=0$  e  $T$  alto.**

Se  $N$  è il numero di coppie di basi del DNA e  $\gamma_0$  è il numero di coppie di basi presenti in un giro della doppia elica, in determinate condizioni ambientali, allora la differenza

$$\tau = L_k - N/\gamma_0$$

esprime il numero di superavvolgimenti in un DNA circolare in determinate condizioni. Quando  $\tau \neq 0$ , il DNA circolare non può formare un anello che giace su un piano con avvolgimento dell'elica di valore pari a  $\gamma_0$ ; quindi o cambia l'avvolgimento dell'elica o la molecola di DNA nel suo complesso deve superavvolgersi nello spazio. In effetti, per  $\tau \neq 0$  si verificano entrambi gli eventi: il DNA circolare si superavvolge e cambia il proprio avvolgimento. La distribuzione dell'energia associata al superavvolgimento del DNA (cioè con  $\tau \neq 0$ ), tra l'avvolgimento e il superavvolgimento dell'elica, è determinata dalla rigidità di torsione e di ripiegamento. Queste rigidità sono state

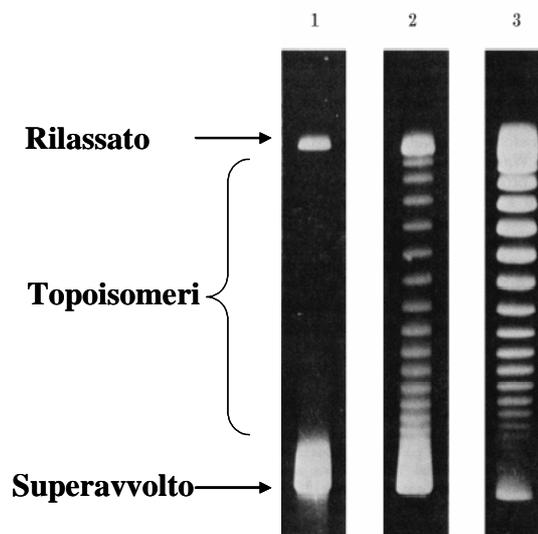
misurate con buona precisione. Ne è risultato che i calcoli teorici del superavvolgimento del DNA sono piuttosto accurati (8).

Molecole di DNA circolari chiuse, estratte da cellule di eucarioti, sono sempre superavvolte negativamente ( $\tau < 0$ , la doppia elica è 'sottospiralizzata').

Di solito il superavvolgimento è caratterizzato da una 'densità' ( $\sigma$ ) della superelica data dall'espressione:  $\sigma = \tau\gamma_0/N$ .

Nei procarioti, l'intero cromosoma consiste spesso in un DNA circolare chiuso a doppio filamento. Anche la maggior parte dei plasmidi sono molecole di DNA circolare.

Il grado di superavvolgimento di un DNA circolare può essere analizzato tramite la sua mobilità elettroforetica su gel di agarosio. Come è mostrato in figura 4, un plasmide superavvolto migra più velocemente della sua forma rilassata in un gel di agarosio (pozzetto 1). Se il plasmide è sottoposto all'azione di una topoisomerasi (pozzetti 2 e 3) esso può trovarsi in diversi stati topologici (topoisomeri) la cui presenza è rivelata dalle diverse bande nel gel di agarosio.



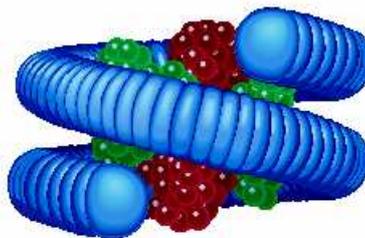
**Figura 4.** Separazione elettroforetica di topoisomeri su gel di agarosio. 1 Separazione elettroforetica di un plasmide negativamente superavvolto; 2-3. Separazione elettroforetica di topoisomeri di DNA plasmidico dopo reazione per tempi diversi con una topoisomerasi I.

### 1.1.3. L'impacchettamento del DNA nella cromatina

Il concetto di superavvolgimento è dunque applicabile al solo DNA circolare chiuso, tuttavia abbiamo visto che le molecole di DNA più grandi, caratteristiche delle cellule superiori, formano strutture a loop con caratteristiche strutturali analoghe alle molecole di DNA circolare chiuso, necessarie perché il genoma degli organismi eucariotici, di dimensioni variabili, sia interamente racchiuso all'interno del nucleo.

Per risolvere i problemi di carattere strutturale e funzionale associati alla dimensione del DNA eucariotico, esso è condensato nella cromatina, una struttura nella quale le lunghe molecole di DNA lineare presentano dei superavvolgimenti dovuti al loro arrotolamento intorno a particelle istoniche con conseguente formazione dei nucleosomi. Ogni nucleosoma è costituito da un "core" costituito da un ottamero istonico  $(H2A-H2B)_2$  e  $(H3-H4)_2$  intorno al quale si avvolge il DNA per una lunghezza di 146 bp e, nel punto in cui il doppio filamento entra ed esce dal complesso istonico, dopo aver compiuto un giro e  $\frac{3}{4}$ , si colloca l'istone H1. Su ciascun nucleosoma il DNA compie quasi due superavvolgimenti negativi con  $\tau = 1.8$  (figura 5).

L'organizzazione dei nucleosomi determina un grado di compattamento del DNA di circa 6-7 volte e rappresenta l'unità di base dell'organizzazione gerarchica della cromatina.



**Figura 5. Rappresentazione tridimensionale di un nucleosoma in cui 146 bp di DNA avvolgono a spirale delle molecole istoniche. Gli istoni H2A e H2B sono rappresentati in rosso, H3 e H4 in verde.**

Il successivo ordine di condensamento del DNA è la fibra da 30 nm che aumenta il compattamento del DNA di 40 volte, ulteriori livelli sono dati da strutture più complesse come le anse radiali, fino alla formazione, durante il processo mitotico, del cromatidio, fondamentale per una segregazione "ordinata" del materiale genetico.

Se un lungo segmento di DNA nella cromatina forma, dunque, strutture ad ansa e le estremità del segmento sono bloccate da componenti proteiche in modo che esse non possano ruotare una rispetto all'altra, allora tale segmento formerà un dominio topologico. Se le proteine istoniche sono rimosse da tale dominio, il DNA sarà sottoposto a una forte tensione di torsione. Negli eucarioti il principale meccanismo di superavvolgimento consiste, dunque, nell'arrotolamento del DNA attorno ai nucleosomi.

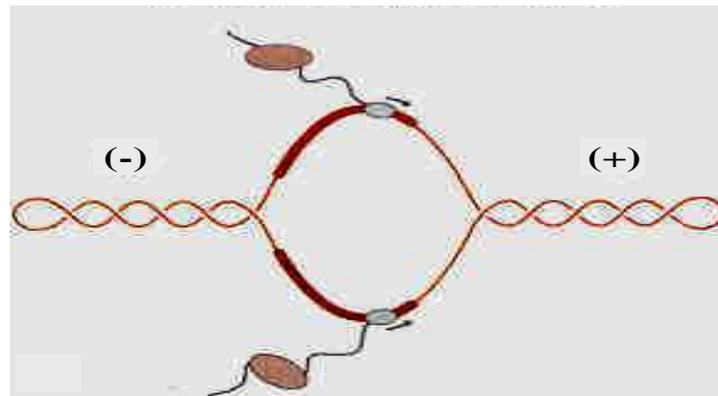
#### **1.1.4. Topologia e trascrizione**

Diversi eventi molecolari che generano superavvolgimenti del DNA avvengono nel nucleo degli eucarioti. Per molti processi biologici che richiedono l'accesso all'informazione genetica, in cui i due filamenti dell'elica devono essere separati temporaneamente, come nel caso della trascrizione e della ricombinazione, o permanentemente, come nel caso della duplicazione, è necessaria una manipolazione topologica del DNA, perché i due filamenti non sono solo appaiati, ma anche avvolti uno intorno all'altro e la loro separazione richiede che essi siano prima srotolati (9). Dato che il DNA si comporta come una struttura mancante di estremità libere di ruotare, una separazione dei filamenti temporanea o permanente determina l'incremento dell'avvolgimento lungo la molecola, producendo una resistenza sempre maggiore ad un ulteriore movimento in avanti. Ogni evento, pertanto, che generi un'onda di denaturazione della doppia elica può determinare stress torsionali a monte e a valle dell'onda. La trascrizione di un gene è uno di questi eventi.

Il processo di trascrizione richiede la rotazione del complesso multiproteico della RNA polimerasi intorno al DNA oppure la rotazione del DNA stesso; poiché il nucleo è un ambiente con alta densità e con alto ingombro sterico, probabilmente l'RNA polimerasi non può ruotare se non, al più, per un brevissimo tratto di stampo. Anche i due filamenti, in una lunga molecola di DNA organizzata nella complessa struttura cromatinica, a loro volta non sono liberi di ruotare uno intorno all'altro. In questi casi, il movimento di traslazione dell'RNA polimerasi lungo la doppia elica determina superavvolgimenti positivi e negativi davanti e dietro la RNA polimerasi che trascrive (figura 6). Questo evento genera due domini topologici distinti ed opposti nel DNA stampo, noti come "twin-supercoiled domain" (10; 11) il cui risultato è un aumento

dello stress torsionale oltre una certa soglia, che può impedire l'ulteriore avanzamento della RNA polimerasi e la sintesi del trascritto.

## Twin-domain model

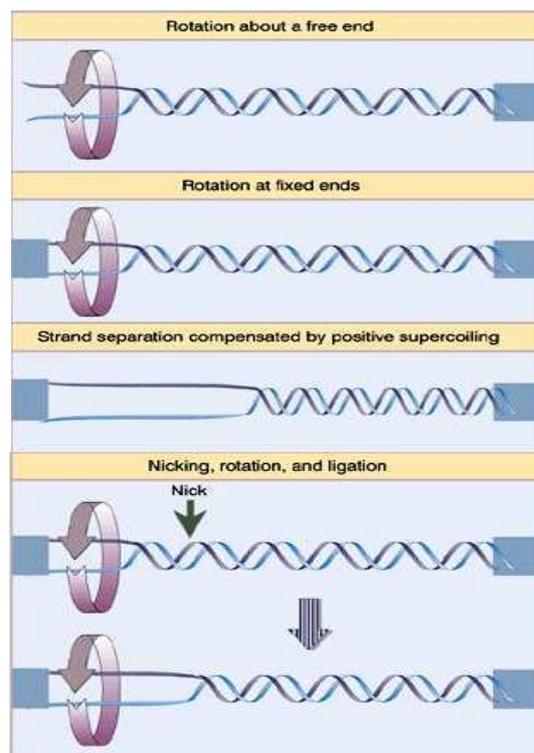


**Figura 6. Twin-domain model. Variazioni topologiche indotte durante i processi di trascrizione. Il superavvolgimento trascrizionale, positivo a valle e negativo a monte della polimerasi, si genera quando si verificano due condizioni: la prima è che ci sia impedimento nella rotazione del complesso trascrizionale attorno al DNA stampo e l'altra è che vi sia una barriera alla rotazione libera dei due filamenti di DNA.**

Nell'organizzazione dell'informazione genetica, sussiste, dunque, un problema topologico, dovuto per molecole di DNA più semplici, alla probabilità di formazione di nodi e allo stato topologico assunto in seguito ad essi, che non può essere alterato da nessun riarrangiamento conformazionale, a meno di un taglio nei filamenti stessi. Per molecole di DNA eucariotico che sono superavvolte negativamente con meccanismi attivi all'interno della cellula, il problema topologico, ossia l'aumento degli stress torsionali, impedisce l'avanzamento e la processività di molti eventi biologici. Tutto questo suggerisce che deve esistere un particolare meccanismo in grado di intervenire nella topologia del DNA.

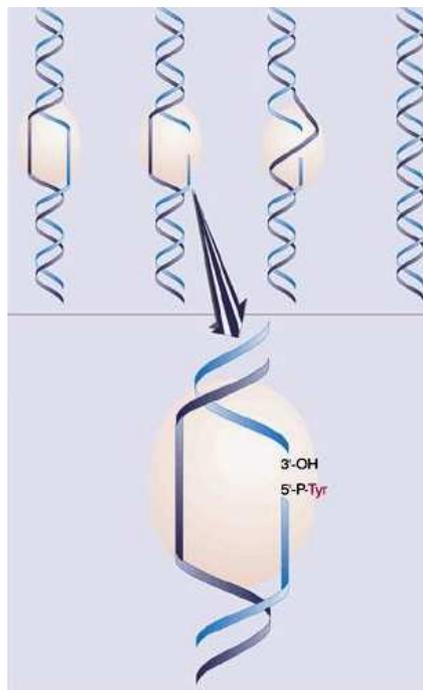
## 1.2. Le DNA Topoisomerasi

Le DNA topoisomerasi sono enzimi che regolano lo stato topologico del DNA nella cellula. Esse giocano un ruolo importante nella replicazione, nella trascrizione, nel rimodellamento della cromatina e nel mantenimento della stabilità genomica poiché risolvono i problemi strutturali derivanti dall'accumulo di superavvolgimenti prodotti da questi processi biologici e permettono il raggiungimento di uno stato stazionario fisiologico. Visto che lo stato topologico degli acidi nucleici non può essere modificato senza un taglio nella catena del DNA, il lavoro di questi enzimi comincia con la creazione di un taglio temporaneo a singolo o a doppio filamento, mentre l'altro filamento, quello rimasto intero oppure un'altra catena, passa attraverso il taglio, seguito dalla ricucitura. Come risultato dell'attività enzimatica, la catena di DNA perde la sua integrità, ma il suo stato topologico risulta cambiato (figura 7).



**Figura 7.** La separazione dei filamenti di DNA a doppia elica è compensata dalla formazione di superavvolgimenti positivi (in alto). Le DNA topoisomerasi determinano taglio, rotazione e rilegazione del filamento (in basso). Immagine tratta da “Genes VI”, B.Lewin, Oxford University Press.

La rottura del DNA avviene tramite un attacco nucleofilo di una tirosina catalitica su un legame fosfodiesterico del filamento che porta alla formazione di un legame covalente tra il gruppo idrossilico della tirosina e il gruppo fosfato di una delle due estremità del filamento tagliato (figura 8). In questo modo si forma un varco per il passaggio di un altro segmento di DNA a singolo o a doppio filamento che determina l'effettivo cambiamento topologico che può consistere, per esempio, nel rilassamento di superavvolgimenti negativi o positivi, in altri termini nella variazione del numero di legami (Lk) oppure nella decatenazione di due anelli di DNA catenati.



**Figura 8. Meccanismo di azione delle DNA topoisomerasi, con ingrandimento del complesso covalente DNA-enzima. Immagine tratta da “Genes VI”, B. Lewin, Oxford University Press.**

La prima DNA topoisomerasi fu purificata nel 1971 da *Escherichia coli* (la proteina  $\omega$ ); da allora questi enzimi sono stati individuati in tutte le cellule eucariotiche e procariotiche e in alcuni virus e batteriofagi. La classificazione più generale delle topoisomerasi è in base al loro meccanismo d'azione: sono definiti di **tipo I** gli enzimi che tagliano solo un filamento di DNA, di **tipo II** quelli che operano una rottura a doppio filamento. Entrambi i due gruppi si dividono in ulteriori sottofamiglie A e B definite in base a considerazioni strutturali; per le topoisomerasi I la sottofamiglia A

comprende le proteine che si legano al 5' fosfato del DNA tagliato e la sottofamiglia B quelle che si legano al 3' fosfato (tabella 1).

	TIPO I		TIPO II	
	A	B	A	B
<i>E. coli</i>	$\omega$ protein Topo III		DNA girasi Topo IV	
<i>S. cerevisiae</i>	Topo III	Topo I	Topo II	(Spo 11)
Virus vaccino		Topo I		
<i>Archea</i> Termofili	Gyr inversa	Top V		Top VI
<i>H. sapiens</i>	Topo III $\alpha$ Topo III $\beta$	Topo I mitTopo I	Topo II $\alpha$ Topo II $\beta$	(Spo 11)

**Tabella 1. Classificazione delle DNA topoisomerasi.**

Le **DNA topoisomerasi di tipo IA** sono enzimi monomerici che tagliano un filamento singolo di DNA formando un legame covalente con il 5' fosfato del filamento rotto. Essi rilassano DNA superavvolti negativamente ma non quelli superavvolti positivamente, possono catalizzare la formazione e rimozione di nodi e l'interconnessione di circoli a singolo filamento, così come la catenazione e decatenazione di circoli di DNA duplex con tagli o gap. Le topoisomerasi IA richiedono  $Mg^{2+}$  per la loro attività. Si osserva inoltre che la reazione non va a completamento perché l'efficienza di questi enzimi è proporzionale al numero di superavvolgimenti negativi e decresce col proseguire della reazione.

Il prototipo di questa famiglia è la topoisomerasi I di *E. coli*. La struttura, di 865 amminoacidi, è organizzata in tre domini: il dominio N-terminale, corrispondente al sito di taglio e di passaggio del filamento integro, contiene la tirosina catalitica; un dominio di legame dello zinco(II) che contiene tre domini tetracisteinici; il dominio C-terminale, ricco di amminoacidi basici per il legame al DNA a singolo filamento. Le topoisomerasi III di *E. coli* e *S. cerevisiae*, pur essendo della stessa sottofamiglia, mancano del dominio di legame per lo zinco, mentre la III $\alpha$  umana ne possiede uno fortemente omologo a quello della IA di *E. coli*.

La figura 9 rappresenta la struttura cristallografica della topoisomerasi I di *E. coli*: il dominio I è composto da un foglietto  $\beta$  antiparallelo testa-coda a 4 filamenti e da

quattro  $\alpha$  eliche; anche il dominio IV, successivo al I, è fatto di  $\alpha$  eliche; segue il dominio II in alto, e il III che contiene la tirosina catalitica all'interfaccia col dominio I. Il movimento di due regioni cerniera, la II-IV e la II-III, permette al dominio III di sollevarsi a formare un canale per l'entrata del DNA nella cavità centrale.

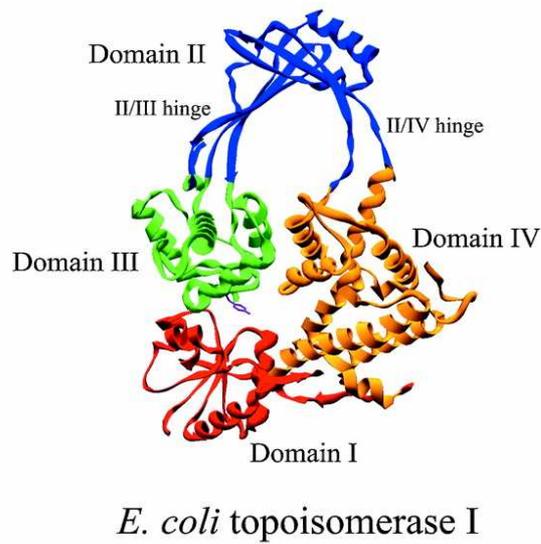
Il meccanismo d'azione prevede un cambiamento conformazionale del dominio III in modo che l' OH nucleofilo della tirosina sia vicino al legame fosfato da rompere. Dopo il taglio, il 5' è legato dalla tirosina, mentre l'altra estremità è legata da un sito di legame nucleotidico del dominio I; il dominio III si solleva dal I per formare un cancello attraverso il quale passa il filamento integro o la regione del DNA duplex che deve essere decatenato. Subito dopo l'enzima si richiude ed il filamento tagliato è rilegato (figura 10). Poiché l'energia di legame è conservata nell'intermedio DNA-proteina nessun cofattore energetico è richiesto per le reazioni di transesterificazione e per l'attività catalitica.

Le DNA **topoisomerasi di tipo IB** sono strutturalmente e funzionalmente distinte dai membri della sottofamiglia IA. Questi enzimi formano un intermedio covalente con il 3' fosfato del DNA tagliato, possono rilassare superavvolgimenti positivi e negativi e la reazione va a completamento. Non hanno siti di legame per ioni metallici e non richiedono  $Mg^{2+}$  per il rilassamento del DNA.

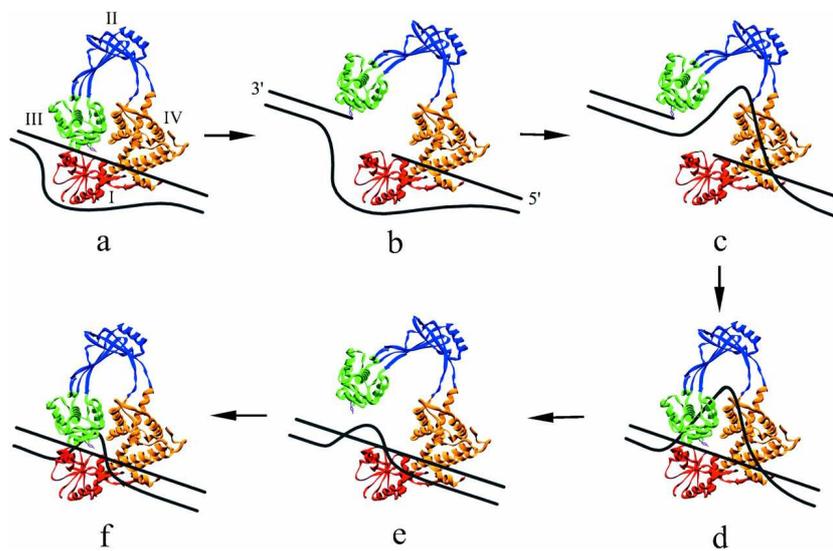
Il prototipo di questa famiglia è la topoisomerasi I umana. Sulla base della struttura cristallografica e di analisi biochimiche della proteina, la topoisomerasi IB è organizzata in quattro distinti domini: un dominio N-terminale (non presente nel cristallo, figura 11), un dominio centrale ("core domain"), un dominio "linker" e un dominio C-terminale (figura 12). I singoli domini proteici, espressi in batteri, possono ricostituire un'attività di rilassamento del DNA quando mescolati insieme, anche se l'enzima ricostituito si lega al DNA con affinità inferiore rispetto all'enzima intatto, e l'equilibrio taglio-ricucitura è spostato verso la ricucitura (12).

Il dominio N terminale, di circa 200 residui, non conservato e molto carico, è dispensabile per l'attività catalitica; contiene segnali di localizzazione nucleare (13) e siti di interazione con altre proteine cellulari.

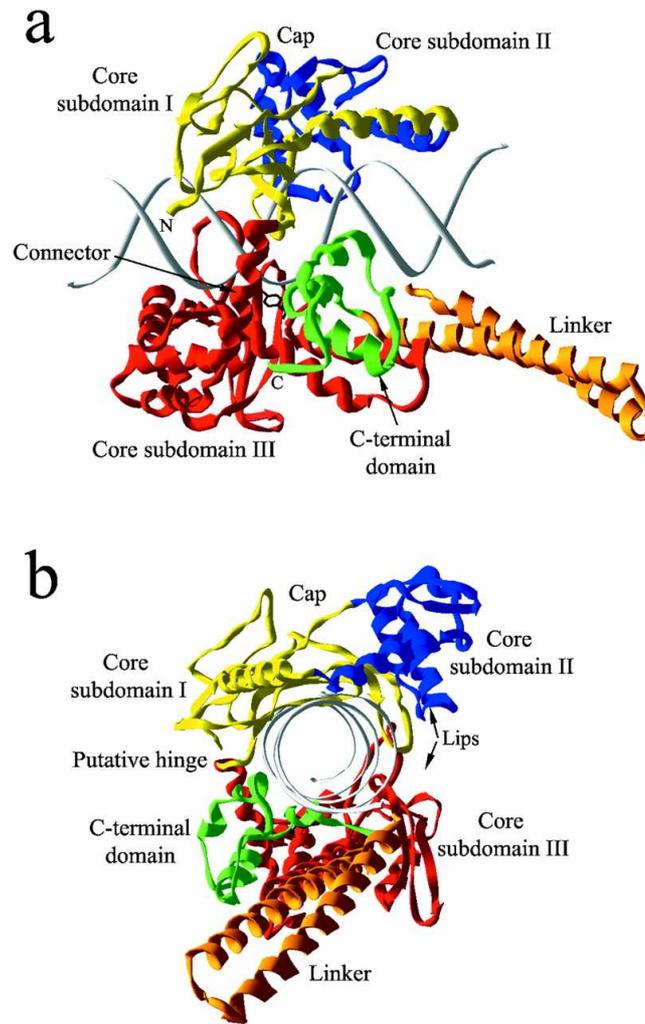
Il dominio core, altamente conservato, contiene tutti i residui catalitici meno la tirosina attiva; segue il dominio del linker, più breve e meno conservato, ed è seguito dal dominio C-terminale contenente la tirosina catalitica.



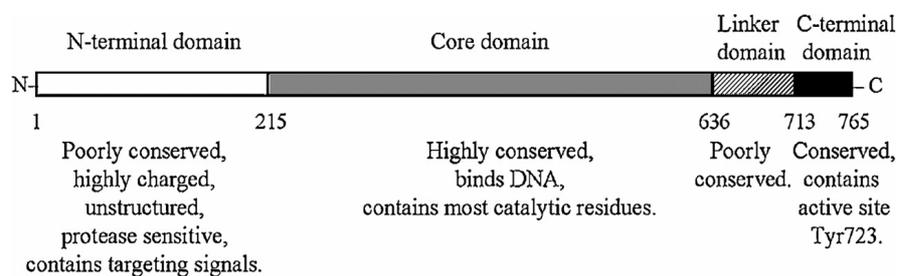
**Figura 9: Struttura cristallografica della topoisomerasi I di *E. coli*. Il dominio I è colorato in rosso, il II in blu, il III in verde, il IV in arancione. Sono in evidenza i due punti di connessione fra il dominio II e gli altri domini.**



**Figura 10: Meccanismo proposto per il rilassamento da parte della topoisomerasi IA.**



**Figura 11: Struttura della topoisomerasi I umana. Nella sezione A, l'enzima è mostrato con l'asse del DNA orizzontale, nella B perpendicolare al foglio. Il sottodominio I del core è in giallo, il II in blu, il III in rosso, il linker è in arancione, il C terminal domain in verde.**



**Figura 12. Domini della topoisomerasi IB umana. I confini fra i domini sono basati su allineamenti di sequenze, studi di proteolisi e cristallografici.**

La struttura cristallografica della topoisomerasi I umana è stata risolta: i cristalli comprendono complessi enzima-DNA in cui l'enzima è legato covalentemente e non covalentemente alla doppia elica. La figura 11 (a e b) mostra un co-cristallo dell'enzima, mancante dei circa 200 residui del dominio N terminale, in legame non covalente con un oligonucleotide di 22 paia di basi.

La proteina forma un anello che avvolge la doppia elica del DNA e che è costituito dai domini core e C-terminale. In particolare, il dominio core è suddiviso, dal punto di vista della struttura terziaria, in tre sottodomini: I, II e III. Una parte dell'anello comprende i due sottodomini I e II che si strutturano insieme costituendo il "cap" della proteina (b). L'altra parte dell'anello, nota come base della proteina, consiste del sottodominio core III e del dominio C-terminale ed è connessa alla prima da una lunga  $\alpha$  elica chiamata connettore. Dal lato opposto di questa elica, i sottodomini II e III sono in contatto mediante due brevi anse, dette "lips", che, interagendo attraverso soli sei amminoacidi e un ponte salino, hanno la funzione di connettere il cap alla base della proteina. L'apertura e la chiusura della proteina per il legame ed il rilascio del DNA avviene per interazione di queste zone.

Tra il sottodominio core III e il dominio C-terminale si trova il dominio del linker, organizzato in una struttura a due lunghe  $\alpha$  eliche che protrude dall'anello proteico. La funzione del linker sembra essere quella di regolare la rotazione del filamento tagliato intorno all'altro (14). Tale funzione viene persa introducendo una discontinuità, nella catena polipeptidica, nella giunzione tra il linker ed il dominio C terminale. Infatti, è stato dimostrato che il dominio linker risulta protetto dalla proteolisi quando l'enzima è legato, in modo non covalente, al DNA, mentre è suscettibile al taglio quando non c'è il legame all'acido nucleico (14), e da ciò si pensa che il linker interagisca con il DNA. Inoltre il linker stesso pare contribuire alla processività dell'enzima e permettere all'enzima di lavorare a concentrazioni saline che altrimenti lo inibirebbero (12). Infatti, mutazioni nel dominio linker che aumentano la processività dell'enzima, ne aumentano anche la sensibilità alla camptotecina, un veleno specifico della Topoisomerasi I (15).

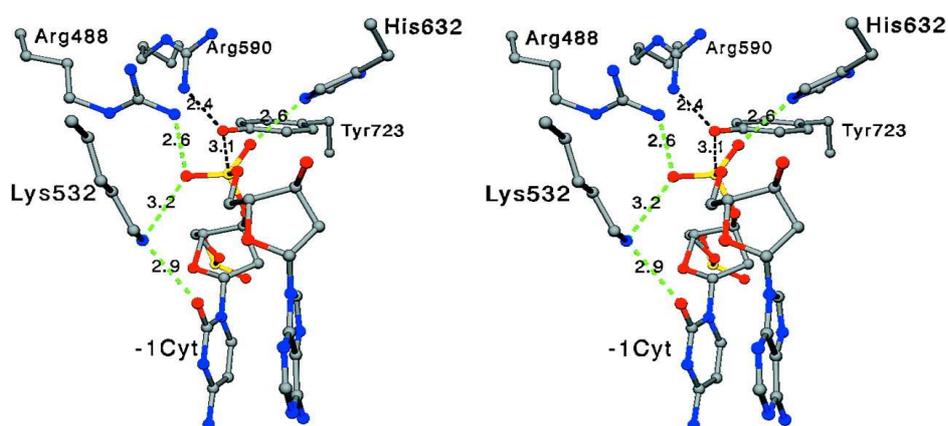
La specificità per il substrato è sia a livello della sequenza nucleotidica, sia a livello della struttura terziaria del DNA. L'enzima taglia il DNA in un sito preferenziale di taglio mediante il riconoscimento di una sequenza consenso lassa che si estende su 4

paia di basi, (da -4 a -1 rispetto all'effettivo sito di taglio 0): si tratta della sequenza 5'-(A/T)(G/C)(A/T)T-3' con l'enzima covalentemente legato al residuo T -1.

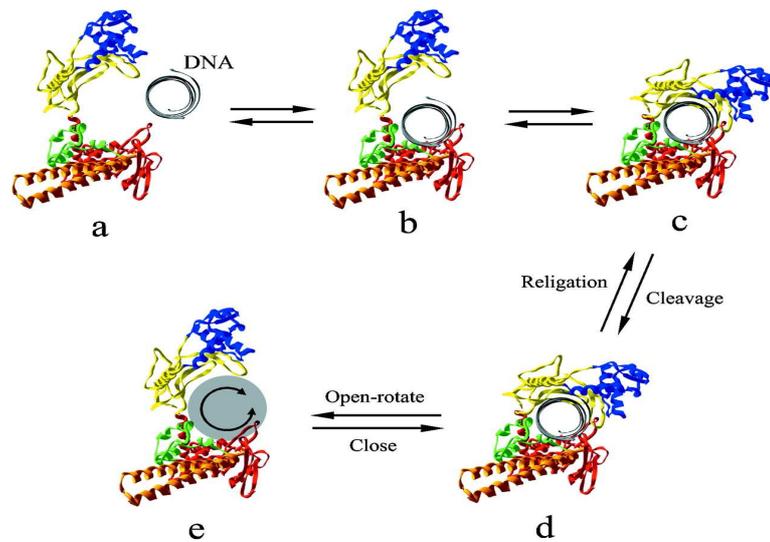
Il sito attivo della proteina è costituito da cinque residui: Arg 488, Arg 590, His 632, Lys 532, Tyr 723 e l'attività catalitica ha come fulcro l'azione della tirosina il cui ossidrilico assume una conformazione tale da permettergli l'attacco nucleofilo e la successiva formazione di un legame covalente con il terminale 3' del filamento di DNA tagliato, poiché viene a trovarsi sullo stesso piano dell'ossigeno 5 del fosfato. Gli altri residui restano vicini al legame fosfodiesterico e contribuiscono alla stabilizzazione dello stato di coordinazione pentavalente del fosfato, attraverso il legame con l'O1 dalla Arg 488 e dall'Arg 590 e con l'O2 dalla Ser 632 e attraverso il legame idrogeno tra l'N2 della Lys 532 e l'O5 che ne riceve un protone a causa della stretta vicinanza (16).

La chiave della catalisi è dunque l'organizzazione tridimensionale dei residui del sito attivo intorno al sito di taglio del DNA. La figura 13 mostra l'attacco nucleofilo della Tyr 723 sul sito di taglio.

Il modello del meccanismo enzimatico è noto come "rotazione controllata": una volta che il DNA è stato tagliato e l'enzima è legato al terminale 3', il terminale 5' ruota intorno al filamento non tagliato in modo non completamente libero, ma in qualche modo frenato dall'interazione con il cap e con il linker della proteina (figura 14). Il rilassamento dello stress torsionale avviene attraverso uno o più cicli di rotazione controllata.



**Figura 13. Stereochimica della catena amminoacidica nel sito attivo della topoisomerasi I umana. I legami idrogeno sono indicati in linee verdi tratteggiate, le distanze sono espresse in Angstrom.**



**Figura 14. Meccanismo di rilassamento tramite rotazione controllata da parte della topoisomerasi I umana.**

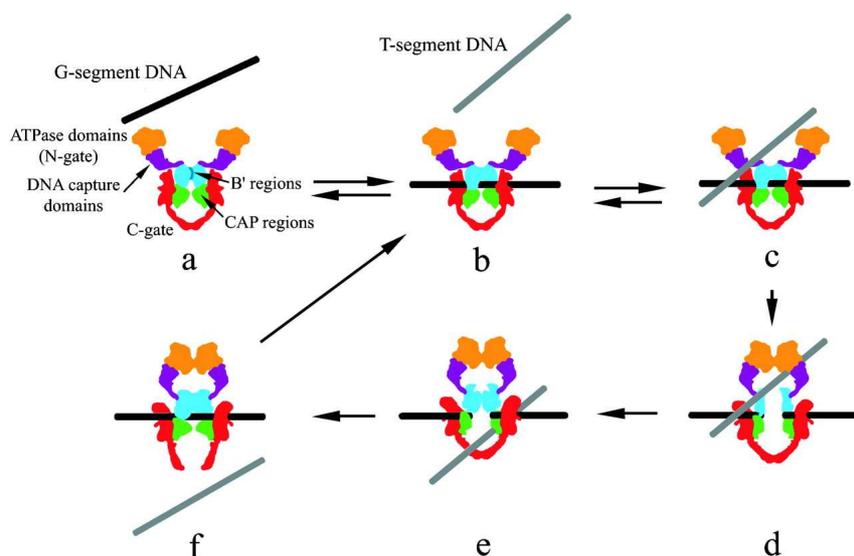
A differenza delle topoisomerasi I, le topoisomerasi II sono enzimi che legano il DNA in forma dimerica e tagliano il duplex su filamenti opposti. Il taglio, che necessita del legame covalente di ciascuna subunità del dimero al 5' del DNA attraverso un legame fosfotirosinico, introduce una rottura a doppio filamento attraverso cui passa il DNA duplex della stessa molecola o di una molecola differente. Solo le topoisomerasi II pertanto sono in grado di catenare/decatenare due molecole di DNA. La reazione richiede  $Mg^{2+}$  e l'idrolisi di ATP.

Un esempio delle **topoisomerasi IIA** è la DNA girasi di *E. coli* che mostra una forte omologia con le altre topoisomerasi note dello stesso tipo, cioè la topoisomerasi IV di *E. coli* stesso, i due isoenzimi umani topoisomerasi II  $\alpha$  e  $\beta$ , la topoisomerasi II di *S. cerevisiae* e del fago T4.

La DNA girasi è fatta da due subunità: la *gyrB* corrisponde all'N-terminale dell'enzima eucariotico, e la *gyrA* che si allinea con il C-terminale dell'enzima eucariotico. Analogamente al dominio N-terminale della topoisomerasi IB, il dominio C-terminale degli enzimi di tipi IIA è importante per il trasporto nel nucleo e per le interazioni con le altre proteine. La tirosina catalitica è localizzata a circa 120 amminoacidi dal dominio N terminale di *gyrA*; il sito di legame per l'ATP è nei primi 400 residui di *gyrB* ed è seguito da una regione collocata nel C-terminale che media l'interazione tra le due metà dell'enzima dimerico.

La struttura cristallografica della proteina funzionale intera manca, ma sono stati risolti alcuni frammenti che forniscono informazioni strutturali utili, che insieme alle evidenze biochimiche, delineano un buon modello molecolare del meccanismo catalitico. Ognuna delle due subunità del dimero è costituita da un dominio ATPasico, da un dominio centrale che lega il DNA e contiene la Tyr catalitica e un dominio C-terminale non conservato tra i membri della sottofamiglia. Il primo passo della reazione è il legame del segmento di DNA da tagliare (il segmento G) ad un sito di legame per il DNA ad alta affinità ad opera del dominio centrale della proteina. Intanto anche il filamento complementare T viene catturato nel dominio ATPasico (uscita-N); una volta intrappolato, è fatto passare attraverso l'apertura nel filamento G verso l'uscita C e quindi verso la cavità inferiore della proteina. Per ogni ciclo in cui il segmento T non viene intrappolato, sul segmento G non è permesso il taglio e l'apertura.

Una serie di cambiamenti conformazionali avvengono durante tutto il corso della reazione, dovuti all'interazione fra l'enzima, il substrato di DNA e l'ATP che viene idrolizzato ad ADP dopo il taglio per aiutare il trasporto del filamento T e per ricucire il DNA. Il ciclo è completato con la rapida richiusura dell'uscita C seguita dall'idrolisi di una seconda molecola di ATP. Il rilascio dell'ADP permette di riaprire l'uscita-N e di iniziare nuovamente il ciclo catalitico (figura 15).



**Figura 15. Meccanismo proposto per il rilassamento del DNA operato dalla topoisomerasi IIA.**

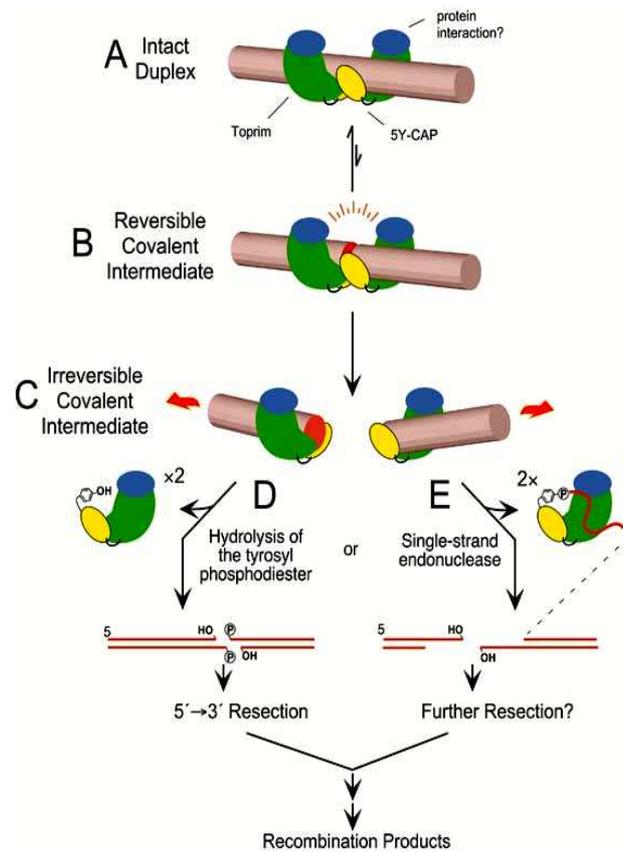
Il prototipo delle **DNA topoisomerasi di tipo IIB** è la topoisomerasi VI dell'archeobatterio *Sulfolobus shibatae*. L'enzima è un tetramero  $A_2B_2$ ; c'è una debole omologia fra il dominio N terminale della subunità B e il dominio ATPasico della topoisomerasi IIA. La subunità A, invece, è distinta da ogni altra topoisomerasi e mostra omologia con la proteina Spo11 di *S. cerevisiae* che è coinvolta nel taglio del DNA all'inizio del meccanismo di ricombinazione omologa durante la meiosi.

Il meccanismo catalitico è simile a quello della topoisomerasi IIA, il solco centrale carico positivamente ha le dimensioni corrette per funzionare da sito di legame per il segmento G del DNA. Una differenza notevole rispetto alle topoisomerasi IIA è la mancanza della cavità inferiore che fa da cancello di uscita per il segmento T del DNA dopo il trasporto.

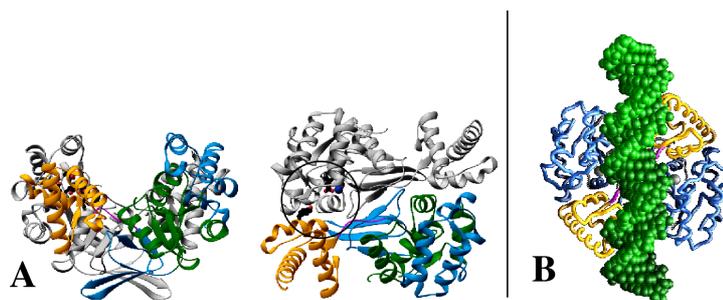
In *S. cerevisiae* la ricombinazione meiotica inizia con la formazione di una rottura a doppio filamento. Tale rottura è effettuata da Spo11 che inizialmente rimane legata al DNA per formare un complesso DNA-proteina e successivamente viene rilasciata e il 5' del DNA tagliato viene degradato per generare un 3' a singolo filamento. Quest'ultimo invade una doppia elica di DNA omologa per formare una giunzione di Holliday e terminare il processo di ricombinazione.

Nel meccanismo d'azione proposto per Spo11 (17), la Tyr135 della proteina attaccherebbe la catena di DNA generando un legame fosfotirosinico tra la proteina e il 5' del DNA. Negli stadi iniziali di questo processo un dimerico di Spo11 formerebbe un complesso di "pre-taglio" in cui si stabilirebbe un equilibrio fra forme tagliate e non del DNA. L'attivazione di tale complesso sarebbe in grado di generare un taglio irreversibile e la dissociazione di Spo11. A questo punto il 5' libero potrebbe essere generato dall'idrolisi del legame fosfotirosinico o dal taglio di una endonucleasi a valle (Figura 16). Oltre a Spo11 in tale processo intervengono altre proteine quali RAD50, MRE11 e XRS2.

Spo11 è omologa a Top6A di *Methanococcus jannaschii*, nella figura 17 è possibile vedere come tale proteina (forse in modo analogo anche Spo11) sia in grado di legare il DNA.



**Figura 16. Meccanismo d'azione di Spo11.**



**Figura 17. Struttura di Top6A: A. Proiezione ortogonale del dimero a forma di U con un monomero colorato e l'altro in grigio. La regione nel cerchio contiene il putativo sito catalitico. B. Modello del legame al DNA di Top6A. La freccia in rosa indica l' $\alpha$ -elica che contatta il DNA (James Berger, UC Berkeley).**

### 1.3. Inibitori e veleni delle DNA Topoisomerasi

Un gran numero di farmaci antibatterici ed antitumorali sono stati individuati per la capacità di esplicare la loro azione citotossica interferendo con l'attività catalitica delle DNA topoisomerasi. E' necessario distinguere fra due grosse classi di farmaci:

**Veleni:** sono composti che agiscono stabilizzando l'intermedio covalente del ciclo catalitico, in cui i filamenti di DNA sono tagliati e legati covalentemente alla proteina. Tali composti agiscono trasformando le topoisomerasi in tossine letali che danneggiano il DNA stesso stimolando la rottura del DNA in seguito alla stabilizzazione del complesso covalente.

**Inibitori:** composti che inibiscono il ciclo catalitico senza stimolare la rottura ma bloccando l'accesso dell'enzima al DNA legandosi loro stessi al DNA. Inibiscono l'attività catalitica dell'enzima ma non stabilizzano il complesso covalente di rottura (18).

La sensibilità ai veleni è aumentata da una overespressione delle topoisomerasi, mentre una riduzione dell'attività dell'enzima può comportare resistenza delle cellule a questi farmaci. Gli inibitori, al contrario, hanno maggiore attività in cellule con bassa espressione dell'enzima (19; 20).

#### 1.3.1. Veleni della DNA topoisomerasi I: la CPT

Alla classe dei veleni della topoisomerasi I (figura 19) appartengono la camptotecina (CPT) e i suoi derivati, usati, prevalentemente, nella cura dei tumori solidi. Questo farmaco, scoperto circa 35 anni fa, è un alcaloide estratto dall'albero *Camptotheca acuminata*; la sua identificazione come antitumorale è molto più recente. Studi clinici con il sale sodico della CPT, ora conosciuto essere una forma inattiva del farmaco, sono stati interrotti a causa degli effetti molto tossici (21). Successivamente sono stati sviluppati derivati solubili in acqua e con minori effetti tossici, come CPT-11 e topotecano. Il topotecano (Hycamtin®) è usato tuttora nel trattamento di tumori ovarici, CPT-11 (Irinotecan®) di tumori al colon. Benché CPT-11 sia debolmente attivo contro la topoisomerasi, il suo metabolita, SN-38, è fra i più potenti veleni di questo enzima. Altri derivati usati in recenti studi clinici sono: 9-amminoCPT (9-AC) e la 7-N-metilpiperazinometil-10,11-etilendirossi-20-S-CPT (19).

Alcuni studi su ceppi di lievito *Δtop1*, in combinazione con le mutazioni per la permeabilità ai farmaci e alla delezione del gene RAD52, hanno dimostrato che mentre le cellule di lievito che mancano della topoisomerasi I sono completamente resistenti alla CPT, le cellule che esprimono l'enzima sono estremamente sensibili (Nitiss, 1988). Questi esperimenti identificano la topoisomerasi I come unico bersaglio cellulare della CPT; l'espressione plasmidica della topoisomerasi I di lievito o umana è necessaria e sufficiente per ripristinare la sensibilità al farmaco di cellule di lievito prive della topoisomerasi I (22).

La CPT è una molecola planare a forma di arco; ha un anello lattonico terminale che la rende instabile in soluzione acquosa a causa di una rapida e non enzimatica idrolisi pH dipendente verso una forma aperta e carbossilata dell'anello, nella quale funziona da farmaco meno potente sulla topoisomerasi. A pH neutri o basici, l'equilibrio per questa reazione di idrolisi favorisce la formazione della specie carbossilata meno attiva, mentre a pH acidi è favorita la formazione della forma lattonica attiva (23). A dispetto della planarità della molecola, essa non si intercala al DNA. L'interazione avviene con una guanina nel solco minore, alcuni studi suggeriscono un'interazione diretta tra la forma carbossilata della CPT e il DNA (24).

Se in assenza di CPT non è stata evidenziata nessuna preferenza da parte delle Topoisomerasi I per la posizione +1, in presenza di CPT invece, in +1 è preferita una guanina (G). Vari esperimenti con oligonucleotidi diversi, con basi differenti nella posizione +1, hanno dimostrato che il taglio indotto dalla CPT è massimo quando c'è una G, mentre è minimo quando c'è una T, un valore intermedio ai due si riscontra quando è presente una adenina o una citosina (19).

Il complesso della topoisomerasi I umana covalentemente legato alla doppia elica del DNA e al farmaco è stato cristallizzato. Dalla struttura ai raggi X si vede che la CPT mima una coppia di basi del DNA e si lega al sito di taglio intercalandosi nella posizione -1 a monte e +1 a valle. L'intercalarsi sposta il DNA a valle, e ciò previene la ricucitura del filamento tagliato. Il farmaco agisce come un inibitore non competitivo (25).

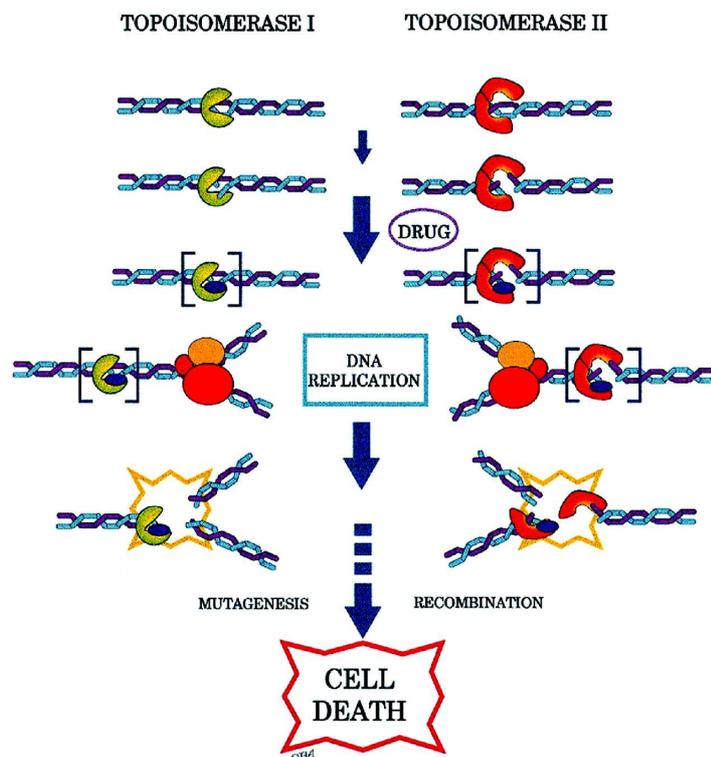
La stabilizzazione del complesso covalente DNA topoisomerasi indotta dal farmaco porta a morte cellulare attraverso passaggi successivi (figura 18; 26):

- il complesso di taglio dà luogo ad un danno citotossico. I complessi DNA topoisomerasi I stabilizzati dalla CPT durante le fasi G1 e G2 sono meno tossici di quelli stabilizzati durante la fase S, perché i complessi di taglio di per sé non danno lesioni citotossiche. Esse sono provocate, invece, dall'interazione tra il complesso e la forza replicativa che avanza lungo il DNA, provocando delle rotture a doppio filamento.

- risposta al danno al DNA. Una volta generate le lesioni citotossiche, si avvia la risposta cellulare mediante la segnalazione del danno indotto, l'arresto del ciclo cellulare, l'attivazione di pathway coinvolti nel riparo o nella risposta allo stress, l'avviamento dei macchinari enzimatici dell'apoptosi.

- morte cellulare programmata. Dopo trattamento con il farmaco le cellule mostrano caratteristiche morfologiche e biochimiche di apoptosi. Morfologicamente si ha perdita di volume cellulare, iperattività della membrana plasmatica e condensazione dell'eterocromatina periferica seguita dal taglio del nucleo e del citoplasma in corpi apoptotici multipli contenenti frammenti nucleari. I cambiamenti biochimici che accompagnano la morte cellulare programmata includono l'espressione del gene che codifica per il fattore di trascrizione jun e del tumor necrosis factor  $\alpha$  simile al Fas ligand; l'attivazione della caspasi 3.

**Figura 18. Meccanismo di citotossicità dei veleni delle Topoisomerasi I e II. Quando gli enzimi si legano al DNA per formare un complesso transiente, essi creano rispettivamente una rottura a singolo o doppio filamento: in presenza di veleni i complessi di taglio (tra parentesi quadre) aumentano e l'incontro tra i siti di rottura e la forza replicativa causa la formazione di rotture permanenti a doppio filamento. Tali eventi culminano nella morte cellulare.**



### 1.3.2. Veleni ed inibitori delle DNA topoisomerasi II

Le DNA topoisomerasi II sono bersaglio di una classe più ampia e varia di composti antineoplastici: epipodofillotossine, antracicline, mitoxantrone (figura 19). Tali veleni possono agire sia impedendo all'enzima di completare il suo ciclo catalitico con la ricucitura del DNA tagliato che aumentando la velocità di reazione di taglio. Gli inibitori della topoisomerasi II sono in grado di utilizzare entrambi i meccanismi. Infatti mentre l'etoposide e le amsacrine sono potenti inibitori della ricucitura (27; 28), agenti quali i chinoloni e le ellipticine aumentano la velocità di taglio da parte dell'enzima (27; 29; 30).

Le caratteristiche principali dei composti che agiscono contro le topoisomerasi II possono essere riassunte come segue.

- Epipodofillotossine. L'etoposide e il teniposide sono derivati semisintetici delle podofillotossine derivate dalla pianta della mandragola. Anche se le podofillotossine si legano alla tubulina come gli alcaloidi della vinca, le epipodofillotossine sono potenti veleni della topoisomerasi II, ed inducono rotture del DNA mediate dall'enzima. L'etoposide viene usato principalmente nel trattamento dei linfomi e del cancro del polmone e del testicolo. Il teniposide viene impiegato soprattutto nel trattamento delle leucemie pediatriche.

- Antracicline Le antracicline agiscono come intercalanti, facendo scivolare la loro struttura ciclica planare perpendicolarmente tra due coppie di nucleotidi dell'elica del DNA. Il risultato è un blocco della sintesi di DNA, RNA e proteine o di tutti e tre. La generazione di radicali liberi può contribuire, ma non è la causa principale, all'effetto antineoplastico. E' stato però dimostrato che questo processo ha un ruolo nella tossicità cardiaca causata da questi farmaci. E' probabile, pertanto, che la citotossicità indotta derivi in realtà dalla sovrapposizione di molteplici meccanismi di danno cellulare. La daunorubicina e l'idarubicina sono due tra i chemioterapici più efficaci nel trattamento delle leucemie acute; la doxorubicina è molto usata per il trattamento di leucemie, linfomi e molti tumori solidi come quello della mammella, del polmone, dell'ovaio e dei sarcomi.

- Mitoxantrone Il mitoxantrone, un antracendione, è un composto di sintesi che consiste di una struttura tricyclica con due catene laterali. Come le antracicline, il mitoxantrone si intercala nel DNA e quindi interferisce con la funzione della

topoisomerasi II. Non ha capacità di produrre radicali liberi ed è pertanto molto meno cardiotossico della doxorubicina. E' registrato per il trattamento della leucemia mieloblastica acuta e viene impiegato anche in altre forme di leucemia, nei linfomi e nel cancro della mammella.

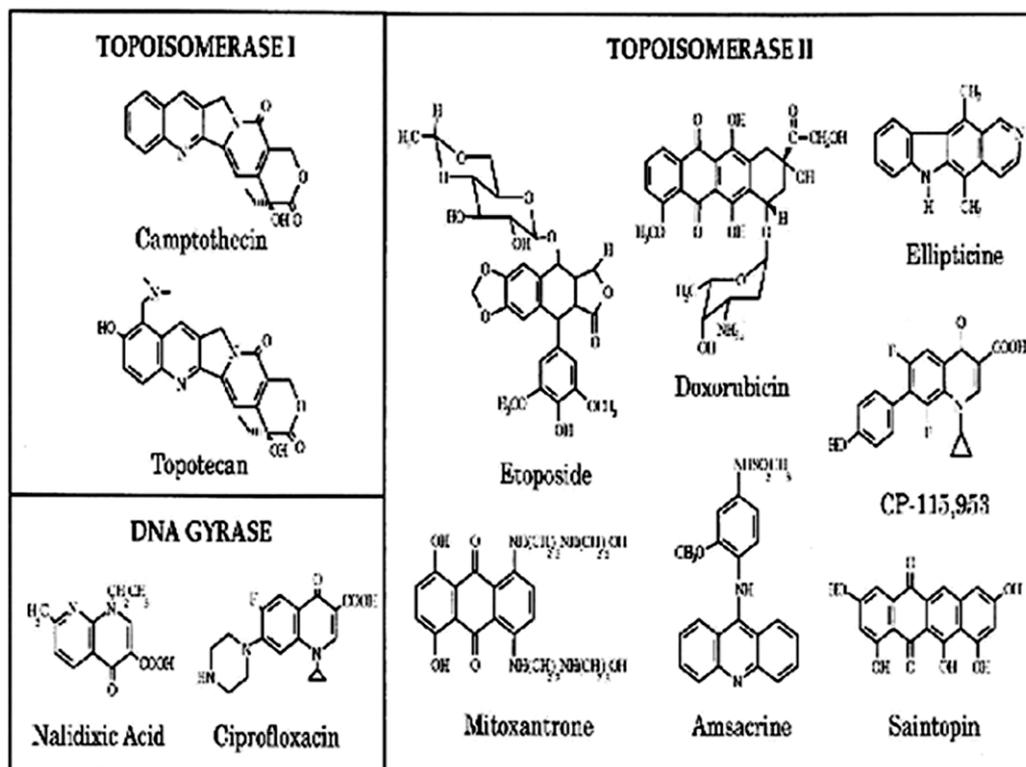


Figura 19. Strutture di alcuni veleni delle Topoisomerasi.

## **1.4. Ruolo delle DNA topoisomerasi nei processi cellulari**

### **1.4.1. Replicazione**

Il processo della replicazione semi-conservativa del DNA e dell'accurata segregazione dei cromosomi richiedono che gli avvolgimenti dei filamenti stampo di DNA siano ridotti a zero (31). E' infatti difficile pensare che la DNA polimerasi e la catena di DNA nascente girino intorno al DNA stampo superavvolto: è più verosimile che sia il DNA stampo a srotolarsi intorno al proprio asse (32).

L'inizio della replicazione richiede l'apertura di una corta regione di DNA vicino all'origine di replicazione (33); man mano che la forza replicativa procede, lo svolgimento del DNA stampo genera dei superavvolgimenti positivi davanti alla forza stessa. Le topoisomerasi sono richieste per rilassare rapidamente i superavvolgimenti positivi accumulati e permettere la progressione della forza, oltre che assicurare che il DNA stampo sia ben dissociato e che i cromosomi replicati siano correttamente segregati nelle cellule figlie. La separazione dei dimeri intercatenati di DNA a doppio filamento circolare è una reazione catalizzata dalla topoisomerasi II, e questo suggerisce che l'enzima è richiesto nel complesso di replicazione (31).

In sistemi procariotici è stata dimostrata (34) la differente richiesta di topoisomerasi in tre stadi della replicazione: l'inizio, l'elongazione e la terminazione e segregazione dei cromosomi replicati. All'inizio, la formazione di un complesso aperto, in cui la doppia elica del DNA non è superavvolta, sull'origine di replicazione richiede l'attività di superavvolgimento negativo della DNA girasi. Poi, un'elicasi replicativa estende l'apertura della doppia elica del DNA, richiesta per l'inizio della sintesi. Infine la decatenazione è affidata alla topoisomerasi IV, che è la topoisomerasi più efficiente a tale scopo e perciò è richiesta negli stadi terminali della replicazione.

La replicazione dei sistemi eucariotici è meno conosciuta nei dettagli. In lievito l'inattivazione della topoisomerasi II da sola non altera in modo significativo la velocità di allungamento della catena di DNA nascente in cellule rilasciate da un arresto del ciclo. Un ritardo temporaneo è stato invece osservato in cellule mancanti della topoisomerasi I (35). Inoltre, in presenza della sola topoisomerasi I i plasmidi di lievito replicati si accumulano in dimeri catenati. Questi esperimenti suggeriscono che in lievito la topoisomerasi I sia principalmente responsabile del controllo del

superavvolgimento durante la replicazione, e che la sua funzione può essere sostituita dalla topoisomerasi II.

In assenza sia della topoisomerasi I che della II la replicazione comincia ma è fortemente difettiva (35; 36): questo significa che nessuno dei due enzimi è richiesto nel complesso d'inizio. La richiesta di topoisomerasi I o II nella replicazione in lievito mostra, inoltre, che la sola topoisomerasi III è insufficiente in questo processo.

### 1.4.2. Ricombinazione

La topoisomerasi IB ha un ruolo importante nel modulare la frequenza di ricombinazione e quindi nel mantenimento della stabilità genomica (33).

L'inattivazione di una qualsiasi delle tre topoisomerasi in lievito ne è un esempio in quanto tutti i singoli mutanti per le topoisomerasi danno lo stesso fenotipo di iper-ricombinazione (31). La prima dimostrazione fu riguardo all'aumento della ricombinazione nei geni dell'RNA ribosomale ripetuti in tandem (rDNA) (38): è poi stato dimostrato che il doppio mutante,  $\Delta top1$  e  $Top2ts$ , presenta un fenotipo di iper-ricombinazione alla temperatura non permissiva a carico di tali geni ma nessun aumento di ricombinazione è osservato per i geni presenti in singola copia. L'iper-ricombinazione è probabilmente causata dall'alto numero di copie dei geni rDNA, dalla loro ripetizione in tandem e dagli alti livelli di attività della RNA polimerasi I (39). La mancanza della topoisomerasi I e II in lievito altera la mobilità in gel del cromosoma XII che contiene tutti i geni dell'rDNA. Contemporaneamente si formano anelli extracromosomali contenenti una o più copie delle unità di rDNA che si mantengono in tale forma grazie a sequenze che funzionano da origini di replicazione. Questi anelli, escissi dal locus cromosomico presumibilmente per ricombinazione omologa, si reintegrano se la topoisomerasi I o II sono espresse di nuovo da un plasmide.

Mutanti della topoisomerasi III crescono molto lentamente. Alcuni studi (37) dimostrano divisione nucleare difettiva e letalità in ceppi di *Schizosaccharomyces pombe* mancanti del gene TOP3, ma la letalità è soppressa dalla concomitante mancanza del gene RQH1 che codifica per un'elicasi omologa a RecQ di *E. coli*. Da qui si ricava che una funzione importante della topoisomerasi III è quella di processare una struttura del DNA prodotta da questa elicasi, per cui l'interazione Top3-Rqh1 potrebbe giocare un qualche ruolo nella replicazione.

Un altro importante coinvolgimento delle topoisomerasi è nella meiosi, dove alti livelli di ricombinazione omologa sono richiesti per disgiungere i cromosomi alla prima divisione meiotica riduzionale. Inoltre, la ricombinazione meiotica comincia con un taglio sulla doppia elica del DNA e studi biochimici indicano che una proteina è covalentemente attaccata a questo sito di taglio. Il gene implicato nell'inizio della ricombinazione meiotica è SPO11, in sua assenza essa non avviene. SPO11 è covalentemente legato al DNA mediante la tirosina catalitica 135: la proteina avvia la ricombinazione mediante una reazione di taglio analoga a quelle viste per le topoisomerasi II (31).

### **1.4.3. Condensazione dei cromosomi**

Alcuni studi suggeriscono che la topoisomerasi II gioca un ruolo importante nella condensazione dei cromosomi durante la mitosi. E' chiamato "scaffold" cromosomico l'insieme di proteine che resta dopo la rimozione degli istoni e del DNA dai cromosomi mitotici. Esaminando le proteine che compongono questa frazione, una delle maggiori componenti è la topoisomerasi II.

Lo studio delle strutture nucleari attorno al DNA estratto da cellule mitotiche di uovo di *Xenopus* ha dimostrato che la topoisomerasi II è richiesta per la formazione della struttura cromosomica condensata. In assenza della topoisomerasi II, l'assemblaggio e la condensazione sono inibite; ma, aggiungendo la topoisomerasi II purificata si ristabilisce la capacità della cromatina di condensare (40). Una volta completata, la morfologia del cromosoma rimane costante anche se la topoisomerasi II è rimossa (41).

Gli stadi finali della condensazione cromosomica vengono bloccati in cellule di *S. pombe*, mutanti per la topoisomerasi II termosensibile, quando portate a temperature non permissive. La condensazione cromosomica non avviene con l'aumento della temperatura. Inoltre l'inattivazione della topoisomerasi II risulta letale in mitosi, quando i cromosomi vengono separati.

Del resto è noto che il mutante della topoisomerasi II in lievito è letale: il suo fenotipo dimostra che l'enzima è richiesto per la terminazione della replicazione e per la segregazione dei cromosomi nella divisione nucleare (42). Il ruolo fondamentale della topoisomerasi II per la segregazione dei cromosomi alla mitosi è probabilmente universale, in quanto l'enzima risulta essenziale in questa fase anche in altri sistemi

modello. L'iniezione di anticorpi contro la topoisomerasi II in embrioni di *Drosophila* ostacola o previene la segregazione cromosomica durante l'anafase (43).

#### 1.4.4. Trascrizione mediata da RNA polimerasi II

Il grado di superavvolgimento del DNA può attivare in modo differenziale i promotori. Evidenze sperimentali suggeriscono la presenza di siti sul DNA lontani dal promotore sui quali le DNA topoisomerasi possono legarsi ed, esercitando la loro azione catalitica, sono in grado di modulare l'espressione di determinati geni. I meccanismi tramite cui la topologia del DNA influenzi la trascrizione non sono ancora ben stabiliti. Nei procarioti è chiaro che la formazione del complesso aperto della RNA Pol è molto favorita da superavvolgimenti negativi del DNA.

Relativamente alla trascrizione mediata da RNA polimerasi II, è noto che la Topoisomerasi I gioca un ruolo in diverse fasi della trascrizione genica, come l'inizio e l'elongazione. Tuttavia, studi in lievito indicano che né Top1, né Top2 siano essenziali per la trascrizione da RNA Pol II *in vivo* (36), mentre l'RNA ribosomale è fortemente limitato da mutazioni che inattivano l'enzima (44).

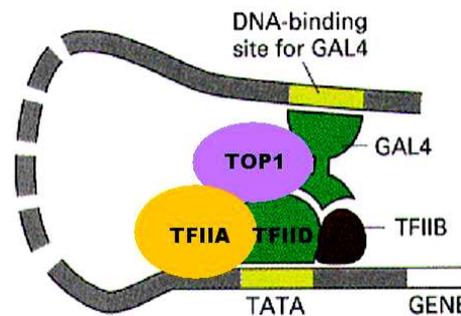
Molte informazioni sono state ricavate dallo studio di mutanti per le topoisomerasi in lievito. In *S. cerevisiae* la capacità di sopravvivere senza Topoisomerasi I suggerisce che il macchinario di trascrizione in lievito non è dipendente da questa proteina: comunque è stato osservato che, all'inizio ed in tarda fase stazionaria, i livelli di mRNA diminuiscono notevolmente secondo un meccanismo Top1-dipendente suggerendo un ruolo della Topoisomerasi I nella repressione trascrizionale generale in fase stazionaria in lievito (45).

La Topoisomerasi I è stata localizzata in regioni attive per la trascrizione, ed è stato dimostrato che tale localizzazione è mediata dal dominio N-terminale, dispensabile per l'attività catalitica, ma critico per il suo reclutamento al complesso di inizio e quindi di elongazione della trascrizione (46; 13).

E' noto che la Topoisomerasi I può influenzare la trascrizione funzionando da attivatore su determinati promotori: è stata dimostrata la sua specifica e diretta interazione con fattori di regolazione e i General Transcription Factors (GTFs) (47). Dato un DNA circolare contenente 5 siti di legame DNA-GAL4 a monte del motivo TATA del promotore di adenovirus (Ad-MPL) è stato osservato che livelli fisiologici di attivazione non possono essere riprodotti in tale sistema di trascrizione ricostruito *in*

*in vitro* composto soltanto da un attivatore TFIIA, da TFIID e dai restanti GTFs; questo contatto è necessario ma non sufficiente, per stimolare l'attivazione della trascrizione sono necessari fattori addizionali: in particolare è necessaria la presenza della topoisomerasi I (Figura 20) (47).

Altri studi hanno dimostrato che un cofattore estratto dal nucleo delle cellule HeLa reprimeva la trascrizione basale e aumentava la trascrizione attivata in presenza dell'attivatore GAL4-AH che contiene gli amminoacidi dall'1 al 147 dell'attivatore GAL4 di lievito, incluso il suo dominio di legame al DNA, fuso ad un corto peptide che serve come dominio di attivazione (48). Questo fattore fu ancora identificato con la topoisomerasi I.



**Figura 20. Coinvolgimento della Topoisomerasi I nel complesso d'inizio della trascrizione della RNA Polimerasi II.**

La prima ipotesi relativa a questa funzione della Topoisomerasi I fu che l'enzima causasse dei cambiamenti conformazionali del DNA sulla regione del promotore, o legandosi al DNA stesso o mediante il rilassamento degli stress torsionali, facilitando direttamente il legame di altri fattori di trascrizione e favorendo energeticamente la formazione di un complesso aperto (48). In realtà l'attività di rilassamento del DNA associato alla topoisomerasi I umana non è richiesta per la repressione della trascrizione, perché il mutante della tirosina catalitica in fenilalanina (Y723F), che manca dell'attività di rilassamento, è comunque attivo nella repressione e nell'aumento della risposta all'attivatore (47; 49).

La topoisomerasi I coattiva la trascrizione in sistemi altamente purificati con TFIIB, TFIIE, TFIIF, TFIID, TFIIA, TFIIH, RNA Pol II e DNA stampo lineare. In assenza dell'attivatore reprime la trascrizione basale dal filamento stampo; in presenza dell'attivatore stimola la trascrizione e la formazione del complesso TFIID-TFIIA che è

il primo stadio critico per l'inizio della trascrizione. Si deve notare che la presenza dell'attivatore in assenza della topoisomerasi I non incrementa la formazione del complesso TFIID-TFIIA (49). Il mutante catalitico della topoisomerasi I, che perde la capacità di rilassare il DNA superavvolto, coattiva la trascrizione proprio come il wild-type (49) suggerendo che le proprietà di legame dell'enzima sono sufficienti per la fase iniziale della trascrizione, mentre le proprietà rilassanti sono richieste per la successiva fase di elongazione. Il modello, per questa seconda fase, è che la topoisomerasi I sia traslocata dal complesso TFIID al complesso di elongazione dove permette lo svolgimento delle tensioni topologiche e garantisce la processività dell'evento.

Sono state identificate alcune proteine in grado di legarsi con il dominio C-terminale (CTD) ripetuto ed iperfosforilato della RNA polimerasi II umana: una di queste fosfo-CTD-associating-proteins (PCAPs) è la topoisomerasi I, insieme ad altre proteine che agiscono sul DNA e sulla cromatina e sono coinvolte nel metabolismo del pre-mRNA (50).

Recentemente sono stati valutati gli effetti di trattamenti con CPT sui siti di legame di RNA PolII su alcuni geni trascritti: si tratta di effetti molto marcati, in quanto i livelli di PolII si abbassano nei siti di pausa prossimi alla regione promotrice ed aumentano lungo la sequenza trascritta in molti geni umani. L'inibizione della Topoisomerasi I da CPT nelle regioni trascritte o nelle regioni regolatorie adiacenti ha una conseguenza diretta ed immediata sulla distribuzione di RNA PolII lungo i geni trascritti in cellule umane. In particolare, è stato proposto che la CPT aumenti la trascrizione di RNA PolII interferendo con la Topoisomerasi I che, in base all'ipotesi formulata, potrebbe avere un ruolo nella regolazione della pausa trascrizionale di RNA PolII (51).

#### **1.4.5. Topoisomerasi I e RNA polimerasi I**

La topoisomerasi I è coinvolta nella regolazione della trascrizione dei geni ribosomali. I geni del DNA ribosomale negli eucarioti sono organizzati in tandem e ripetuti molte volte e la loro trascrizione è affidata alla RNA polimerasi I. Il promotore del gene per l'rRNA 35S è una struttura bipartita, costituita da un Core Promoter Element (CPE) che è vicino al sito d'inizio della trascrizione, e ne controlla l'accuratezza e un Upstream Promoter Element (UPE) richiesto per aumentare

l'efficienza dell'evento d'inizio. Molte proteine regolatorie agiscono su queste sequenze come "trans-acting factors" (52).

In *S. cerevisiae* è stato dimostrato che la topoisomerasi I è implicata nella trascrizione del rDNA mediante footprinting *in vivo* per l'interazione DNA-proteina nella regione del promotore 35S. Il DNA ribosomale di lievito è presente sul cromosoma XII: il CPE del 35S comprende circa 50 nucleotidi sul sito d'inizio della trascrizione; l'UPE copre la regione da -50 a -155. Un'altra sequenza importante coinvolta nella trascrizione dell'rDNA è l'Enhancer Element. Tutta una serie di fattori di trascrizione sono stati geneticamente e biochimicamente identificati: in particolare, il Core Factor (CF) si lega al CPE ed è assolutamente richiesto per la trascrizione; l'Upstream Activation Factor (UAF) si lega ad UPE, ha una funzione stimolatoria per la trascrizione anche se non essenziale ed è direttamente coinvolto nel reclutamento del CF sul promoter per interazione con la TATA binding protein (53).

Sono stati studiati i cambiamenti nella struttura cromatinica che avvengono al locus dell'rDNA di *S. cerevisiae* quando la topoisomerasi I è mancante. Sebbene la vitalità cellulare non sia compromessa, si osserva che l'organizzazione della cromatina per il 35S rDNA è alterata e la sua trascrizione dall'RNA polimerasi I è compromessa durante l'elongazione in ceppi mutanti per TOP1 (54). L'accumulo di rRNA in lieviti, che si dividano per gemmazione o per fissione, richiede l'attività topoisomerasica nella cellula; la RNA polimerasi I è abortiva in sua assenza.

In cellule mutanti per *top1-top2* gli effetti sulla trascrizione dell'rDNA sono duplici: nella fase iniziale si ha accumulo di superavvolgimenti positivi davanti alla polimerasi e negativi dietro (42) che non vengono rimossi, e questi ultimi stimolano fortemente il complesso d'inizio. Ma nella fase di elongazione, la mancanza di rilassamento blocca la RNA polimerasi I, perciò questo modello spiega gli effetti *in vivo* dell'inattivazione delle topoisomerasi sulla trascrizione dalla RNA polimerasi I (55).

Ancora in lievito è stata individuata una subunità della RNA polimerasi I chiamata A34.5, non essenziale nelle cellule wild-type, ma richiesta nei mutanti per la topoisomerasi I (*top1-*). Questa subunità gioca un ruolo nella risoluzione dei problemi topologici associati alla trascrizione della stessa RNA polimerasi I, perché, in assenza di topoisomerasi I, la sua assenza riduce fortemente la crescita del ceppo di lievito (56).

## 1.5. Topoisomerasi I e la cromatina silente in *S. cerevisiae*

Il locus dell'rDNA in *S. cerevisiae* è una delle regioni di cromatina silente insieme alle regioni telomeriche e ai loci per il mating type HML e HMR. Queste regioni mostrano caratteristiche comuni, come l'ipoacetilazione istonica e la dipendenza dalle proteine regolatrici dell'informazione silente (SIR) (57).

Sir2 è una deacetilasi NAD-dipendente che silenzia la trascrizione ai loci suddetti. Le lisine 9 e 14 di H3 e le lisine 5, 8 e 16 di H4 sono generalmente acetilate nella cromatina attiva ed ipoacetilate nella cromatina silenziata. L'overespressione di Sir2 promuove la deacetilazione istonica, suggerendo il ruolo della proteina come istone-deacetilasi (58). Studi mutazionali indicano che le lisine 9, 14 di H3 e specificamente la lisina 16 nella coda ammino-terminale di H4 (59) sono deacetilate da Sir2 e sono criticamente importanti per il silencing, mentre le lisine 5, 8 e 12 di H4 hanno funzioni ridondanti (58).

I meccanismi attraverso i quali il silencing viene stabilito e mantenuto sono simili per le regioni telomeriche e per i loci HMR e HML; i geni dell'rDNA richiedono Sir2 e non altre proteine Sir.

In cellule di lievito  $\Delta$ sir2 si osserva iperacetilazione istonica e perdita della struttura silenziata della cromatina al rDNA. È stato inoltre dimostrato che la Topoisomerasi I causa perturbazioni localizzate nella struttura della cromatina, abolendo il silencing trascrizionale del retrotrasposoma Ty1 integrato nelle ripetizioni in tandem dei geni per l'RNA ribosomale RDN1 (60). In cellule recanti la delezione  $\Delta$ top1, si verifica un decremento della deacetilazione istonica, ciò corrisponde ad un incremento dell'accessibilità alla cromatina, in modo simile a quello che succede con l'inattivazione della Sir2. Il meccanismo proposto è che una maggiore densità di superavvolgimenti dovuta alla mancanza della Topoisomerasi I interferisca con la capacità di altri fattori di reclutare Sir2 (52).

Data l'identificazione di una sequenza consenso degenerata attorno ai siti di taglio della Topoisomerasi I in presenza o assenza di CPT (61; 18) è stato ipotizzato che la proteina possa legare ed interagire con le ripetizioni telomeriche. Anche per Top2 è stata dimostrata l'accessibilità alle regioni telomeriche nella cromatina (62): questi risultati, del resto, sono coerenti col fatto che la cromatina nelle ripetizioni telomeriche

mostra una caratteristica struttura aperta e diffusa accessibile a fattori che agiscono in trans. Successivamente è stato dimostrato che, targettando la Topoisomerasi I al telomero, essa di fatto accede alla cromatina telomerica ed è cataliticamente attiva nel taglio del filamento ricco in GC in presenza di CPT poiché il complesso covalente endogeno Top1-DNA è presente nel DNA telomerico di cellule trattate con CPT (63).

### 1.5.1. Struttura del telomero e meccanismo del silencing telomerico

In *Saccharomyces cerevisiae* la sequenza telomerica è composta da circa 350 bp contenenti la ripetizione della sequenza  $C_{1-3}A/TG_{1-3}$ . Queste ripetizioni sfavoriscono la formazione di nucleosomi e sono organizzate in strutture, chiamate telosomi, strettamente associate alla proteina Rap1 e, di conseguenza, resistenti alle nucleasi.

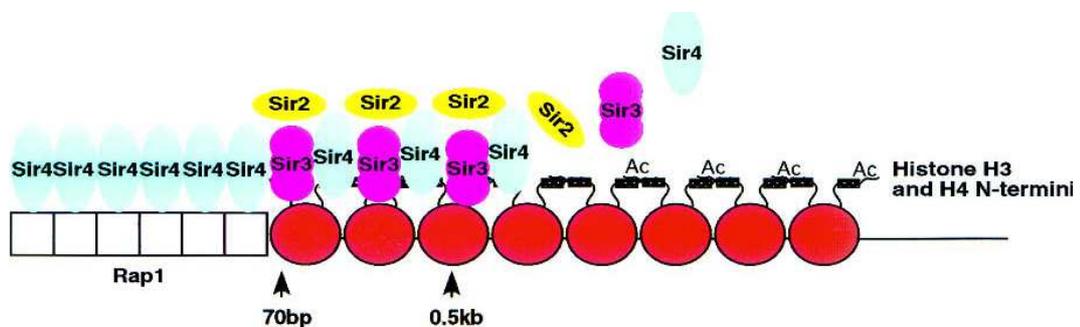
A monte della sequenza telomerica si trovano le regioni, variabili in numero, definite Sub-Telomeric Repeated elements ( $STR_s$ ) e gli elementi X, presenti in forma completa, costituita dal core X e da STR A, B, C e D, oppure in forma più corta formata dal solo core X o da una sola sua parte (64). Il core X è la sola sequenza ripetuta trovata in tutte le terminazioni; esso contiene alcune sequenze funzionali quali ACS (ARS consensus sequence, sito di legame per ORC) in tutti i casi e Abf1p-binding site in 31 su 32 terminazioni. Questi sono due dei tre elementi presenti nei silencer dei loci HM; il terzo elemento Rap1-binding site, si trova nelle ripetizioni  $C_{1-3}A/TG_{1-3}$ . Nelle sequenze STR, c'è anche il sito di legame per la telomere-binding protein Tbf1p, per cui queste sequenze, insieme alle ripetizioni più a valle, sono deputate al reclutamento dei fattori responsabili del silencing.

Nel 70% dei telomeri di lievito si trovano anche altri elementi, definiti elementi Y, che sono molto conservati (64; 65; 66) e manifestano una caratteristica resistenza al silenziamento, al contrario del core X che è sempre fortemente represso. In seguito alla valutazione del “telomeric position effect” (TPE) di un reporter clonato nelle regioni telomeriche, è stato dimostrato che il complesso Rap1/Sir2/Sir3/Sir4-ripetizioni telomeriche interagisce con le proteine legate al core X, permettendo la formazione di un nucleo di cromatina fortemente repressa da cui gli elementi Y sono esclusi tramite la formazione di strutture a loop (67).

Il meccanismo di formazione e mantenimento dell'eterocromatina sia a livello telomerico sia nei loci HML e HMR è ben conosciuto: la proteina Rap1, attivatore

trascrizionale in regioni eucromatiniche (68), lega direttamente le ripetizioni  $C_{1-3}A$  reclutando due diverse classi di proteine: le proteine SIR, che mediano l'effetto TPE, e le proteine RIF che inibiscono l'azione dell'enzima telomerasi ma, soprattutto, competono per l'interazione Rap1-Sir4 (69).

Il ruolo di Sir4, reclutata da Rap1 direttamente e indipendentemente dalla presenza delle altre Sir, non è ancora ben chiaro, ma evidenze sperimentali indicano che il complesso Sir4- Rap1 sia necessario per il reclutamento delle altre proteine Sir. (70). Sir4, infatti, recluta Sir2, antagonista dell'attività acetilasi di Sas2 sugli stessi siti di modificazione istonica (59). L'attività di deacetilasi NAD-dipendente di Sir2 è cruciale nella formazione della cromatina silenziata (mutazioni di K16 su H4 distruggono completamente il silencing telomerico) perché la deacetilazione della lisina 16 su H4 è necessaria per il legame di Sir3, che interagisce con Sir4 (71), con la coda dell'istone H3 ipo-acetilato (72) e con i residui amminoacidici ipo-acetilati 4-28 della coda N-terminale dell'istone H4. La presenza di Sir2 e di Sir3 permette la diffusione dell'eterocromatina dalle prossimità telomeriche fino ad una distanza di circa 2-3 kb con un meccanismo a catena con il quale Sir3 recluta Sir4 che a sua volta recluta Sir2 (figura 21).



**Figura 21. Meccanismo di reclutamento dei fattori coinvolti nella formazione e nella propagazione dell'eterocromatina telomerica.**

Il silenziamento telomerico necessita, dunque, del coinvolgimento di un complesso sistema di fattori proteici e di modificazioni istoniche. Queste modificazioni possono svolgere un'azione diretta a livello trascrizionale sulle sequenze geniche posizionate in tali regioni oppure, indirettamente, un'alterazione della struttura della cromatina in modo da influenzare il silencing. Da qui deriva l'importanza nel silencing degli enzimi che modificano la cromatina.

Dot1 è una metilasi specifica per la lisina 79 di H3; ceppi in cui Dop1 è assente o molto espressa sono difettivi nel silenziamento a causa della ridistribuzione delle proteine Sir lontano dal telomero. Nello stato silenziato, dunque, si genererebbe una sorta di feedback positivo che rafforza la stabilità delle proteine Sir sulla cromatina con K79-H3 ipometilata. Lo stato non silenziato è governato da un feedback positivo in cui la metilazione di K79-H3 indebolisce il legame delle proteine Sir, provocando, a catena, un incremento nella metilazione di K79-H3 ed un successivo indebolimento del legame delle Sir stesse (73).

Set1, un'altra metiltransferasi associata al silencing che agisce in maniera simile a Dot1, metila specificamente la lisina 4 di H3. Il coinvolgimento della metilazione della lisina 4 nel silencing è stato individuato da altri organismi nei quali questa metilazione è associata alle regioni attive del genoma; in *S. cerevisiae*, infatti, le regioni codificanti dei geni attivi sono fortemente metilate, mentre le regioni telomeriche, i loci HM e l'rDNA sono ipometilati nella lisina 4. Nei ceppi *set1Δ*, la delezione influenza il silencing attraverso la riduzione della metilazione in tutto il genoma oppure attraverso la mis-regolazione delle proteine Sir, la cui concentrazione cala nelle posizioni eterocromatiniche ed aumenta nelle regioni adiacenti alle subtelomeriche, suggerendo un ruolo per K4 metilata nella prevenzione della propagazione del silencing fuori dalle posizioni silenziate (74).

La metilazione della lisina 36 su H3 è catalizzata da Set2. Finora era noto che questa metilazione da parte del complesso Rpd3S fosse necessaria per prevenire l'erroneo inizio della trascrizione. Recentemente è stato dimostrato che mutazioni di K36-H3 o delezioni di SET2 causano anch'esse il silencing ectopico di un reporter nelle regioni fiancheggianti dell'eterocromatina del locus del mating type HMRA, perché in cellule *set2Δ* Sir3 si propaga nelle regioni adiacenti (75). Questi risultati implicano che anche la metilazione di K36-H3, come quella di K4, abbia un ruolo nel prevenire la propagazione ectopica del silencing.

Rad6 è un enzima ubiquitinante importante per il silencing. Esso ubiquitina la lisina 123 dell'istone H2B, e questo evento è richiesto per la metilazione sia della lisina 4 su H3 da parte di Set1, sia della lisina 79 su H3 da parte di Dot1. L'ubiquitina idrolasi Dot4, inoltre, interagisce con Sir4 e rimuove l'ubiquitina dall'istone H2B nei nucleosomi associati a Sir4, prevenendo la metilazione di H3 da Dot1 e Set2. (76)

La metilazione della lisina 9 su H3, infine, è un marcatore di cromatina silenziata riportato in molti organismi ma non in *S. cerevisiae*. Essa rappresenta un marker che viene riconosciuto e legato da proteine contenenti cromo-domini, che a loro volta reclutano iston-metiltransferasi per la metilazione di K9 su H3. In altri organismi la cromatina silenziata è marcata e mantenuta usando strategie simili ma proteine completamente diverse.

Per quanto riguarda le modificazioni nell'acetilazione istonica, sono le acetiltransferasi Sas2 e Sas3 che giocano un ruolo chiave nella modulazione del silencing. In particolare, evidenze genetiche indicano che Sas2 acetila la lisina 16 di H4, residuo bersaglio di Sir2: le due proteine hanno ruolo opposto e provvedono, alternativamente, alla formazione dell'eterocromatina completamente ipo-acetilata e alla prevenzione della propagazione dell'eterocromatina nelle regioni adiacenti. Si parla, dunque, di un meccanismo attivo di anti-silencing, dipendente da Sas2, in quanto in mutanti *sas2* è stato osservato l'incremento della localizzazione di Sir3 e dell'ipoacetilazione nelle regioni distali dal telomero, suggerendo un ruolo della proteina nel bloccare la propagazione del silencing (77).

Si suppone, inoltre, che gli enzimi che modificano gli istoni, precedentemente descritti, possano giocare un ruolo importante anche nella determinazione di veri e propri confini delle regioni silenziate agendo sui nucleosomi alle terminazioni dei domini cromatinici silenti.

Un ruolo attivo di anti-silencing è stato attribuito anche all'istone H2A.Z, componente della cromatina eucariotica che sostituisce l'istone convenzionale H2A in una frazione significativa di nucleosomi. In alcuni studi è stato dimostrato che i geni attivati da Htz1 (il gene che codifica per H2A.Z) co-localizzano vicino ai telomeri in piccoli domini cromosomici ed è stata dimostrata una funzione per Htz1 nella protezione dei geni dal silencing Sir-dipendente in queste regioni telomeriche, antagonizzando la formazione di eterocromatina attraverso pathway indipendenti dagli elementi di confine (78).

La funzione della cromatina silenziata è quella di regolare la trascrizione genica di un insieme di geni, in maniera indipendente dalla specifica funzione di ognuno, ma dipendente dalla loro posizione cromosomica. Nel caso dei loci HM, le copie dei geni per il mating type in HML e HMR sono silenziate e solo la copia presente nel locus

MAT è attivamente trascritta; nel caso dei geni per il DNA ribosomale, la presenza di DNA ripetuto in tandem per 100-200 copie rende necessario che, di esse, solo alcune presentino un alto livello trascrizionale, mentre molte altre siano silenziate. Allo stesso modo, i geni telomerici sono repressi in condizioni generali di stress, quasi che la cellula opti per un metabolismo basale in cui le attività secondarie siano ridotte o sopresse

## SCOPO DELLA RICERCA DI TESI

Le DNA topoisomerasi sono richieste durante molti processi nucleari per risolvere stress torsionali ed altri problemi topologici del DNA. Nelle varie fasi della trascrizione, ad esempio, sono necessari passaggi in cui la conformazione del DNA necessariamente subisce degli stress torsionali che possono influenzare la trascrizione stessa, positivamente o negativamente, e che devono essere risolti da un'attività rilassante. E' plausibile, inoltre, che qualsiasi variazione nella struttura della cromatina passi attraverso una variazione della topologia del DNA.

La maggiore attività rilassante è data, nelle cellule eucariotiche, dalla DNA topoisomerasi IB. In letteratura ci sono molte evidenze sperimentali che suggeriscono un ruolo della proteina nella sintesi di RNA ribosomali o mRNA, tuttavia, manca ancora un'analisi globale completa degli effetti della topoisomerasi I sui livelli di tutti i trascritti cellulari. Pertanto, lo scopo del presente lavoro è stato quello di identificare i geni in *S. cerevisiae* la cui trascrizione sia influenzata dalla Topoisomerasi I con un approccio globale utilizzando microarrays contenenti tutte le ORF del lievito. I risultati hanno mostrato una specifica downregolazione dei geni telomerici e sub-telomerici da parte della Topoisomerasi I. Pertanto, abbiamo successivamente voluto indagare il possibile meccanismo attraverso il quale l'enzima possa reprimere o diminuire la trascrizione dei geni telomerici e sub-telomerici.

## Capitolo 2

# MATERIALI E METODI

---

## 2.1. MATERIALI

### Enzimi di restrizione

Tipo	Produttore
Aat II	BioLabs
Age I	BioLabs
Hind III	Fermentas
Sac I	BioLabs
MluI	BioLabs

### Enzimi vari

Tipo	Produttore
PLATINUM™ <i>pf</i> xDNA polymerase 5U/ uL	LifeTechnologies
Taq DNA polymerase 5U/ uL	Promega
DyNAzyme II DNA polymerase 2U/ uL	Finnzyme
Alcaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP)	BioLabs
DNAase I	BioLabs
T4 DNA Ligasi	BioLabs
RNAse A	Sigma

### Farmaci

Tipo	Produttore
Ampicillina	Sigma
Tetraciclina	Sigma
Camptotecina	Sigma

### Ceppi di batteri e lieviti

Tipo	Produttore
E. coli TOP 10 F'	Stratagene
<i>S. cerevisiae</i> JEL1 $\Delta$ top1 (MAT $\alpha$ , leu2, trp1, ura3-52, prb1-1122, pep4-3, $\Delta$ HIS3::pGal1-Gal4, $\Delta$ top1)	Prof. P. Benedetti, Università di Padova
X4004-3a (MATa lys5 trp1 met2 ura3)	ATCC Cell Biology Collection
YOL006C-TAP (MATa, his3 $\Delta$ 1, leu2 $\Delta$ 0, met15 $\Delta$ 0, ura3 $\Delta$ 0, YOL006C-TAP, HIS3MX6)	Open Biosistem
BY4741 (MATa, his3 $\Delta$ 1, leu2 $\Delta$ 0, met15 $\Delta$ 0, ura3 $\Delta$ 0)	Open Biosistem

## Plasmidi

<b>Tipo</b>	<b>Produttore</b>
YCp50	American Type Culture Collection
pCC10	Prof. G. Camilloni, Università "La Sapienza", Roma
TOPO pCR 2.1	Invitrogen
pFA6A-13Myc-His3MX	Mark Longtine, Washington University School of Medicine, St.
pUG27	Euroscarf

In figura 22 è riportata la mappa del plasmide YCp50. Il plasmide porta 3 ORF, una che codificano per URA3: orotidina-5'-fosfato decarbossilasi, AP(R): beta-lattamasi, ampicillina resistenza e TC(R): tetraciclina resistenza. Sono indicate due regioni Poly dG-dC, le sequenze CEN4 (centromero IV) , ARS1 (sequenza di replicazione autonoma) e l'origine di replicazione: PMB1.

In figura 23 è riportata la mappa del plasmide pCC10. Il plasmide è derivato da YCp50, con il clonaggio della ORF per Top1 di *S. cerevisiae*.

In figura 24 è riportata la mappa del plasmide pCR 2.1-TOPO, indicando la regione in cui si inserisce il prodotto di PCR da clonare. Il plasmide ha una ORF per la canamicina resistenza; una ORF per l'ampicillina resistenza; un'origine di replicazione F1; un'origine di replicazione pUC; inLacZ  $\alpha$  c'è il sito di clonaggio interno agli M13 Reverse e Forward priming sites.

In figura 25 è riportata la mappa del plasmide pFA6A-13Myc-His3MX. Il plasmide porta 2 ORF, una che codifica per His3 di *K. Lactis* ed una che codifica per l'ampicillina resistenza. Sono indicate le 13 ripetizioni dell'epitopo Myc-tag, ed i primer con cui la cassetta è stata amplificata.

In figura 26 è riportata la mappa del plasmide pUG27. Il plasmide porta 2 ORF, una che codifica per His3 di *S. pombe*, sotto il promotore TEF, ed una che codifica per l'ampicillina resistenza. Sono indicate le regioni dei due LoxP che fiancheggiano il marcatore per l'auxotrofia e la sequenza del terminatore.

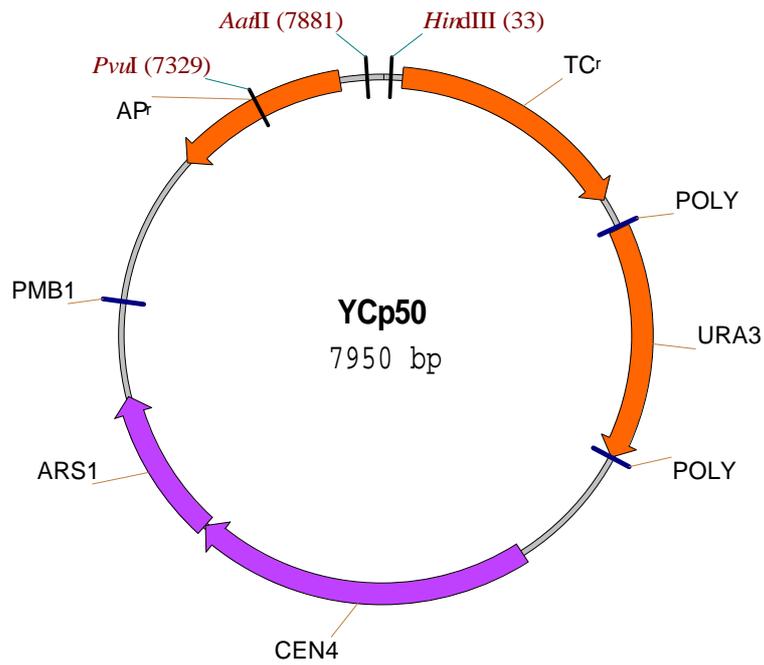


Figura 22. Mappa del plasmide YCp50.

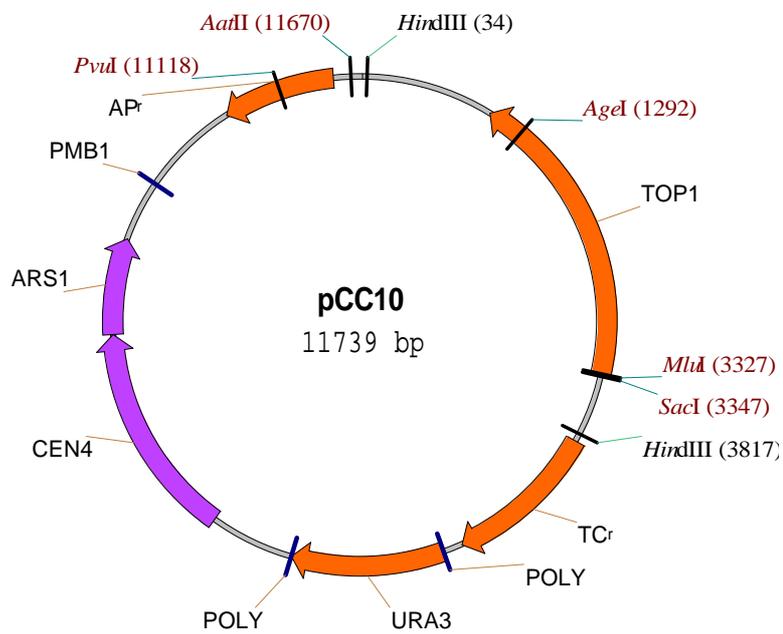


Figura 23: Mappa del plasmide pCC10.

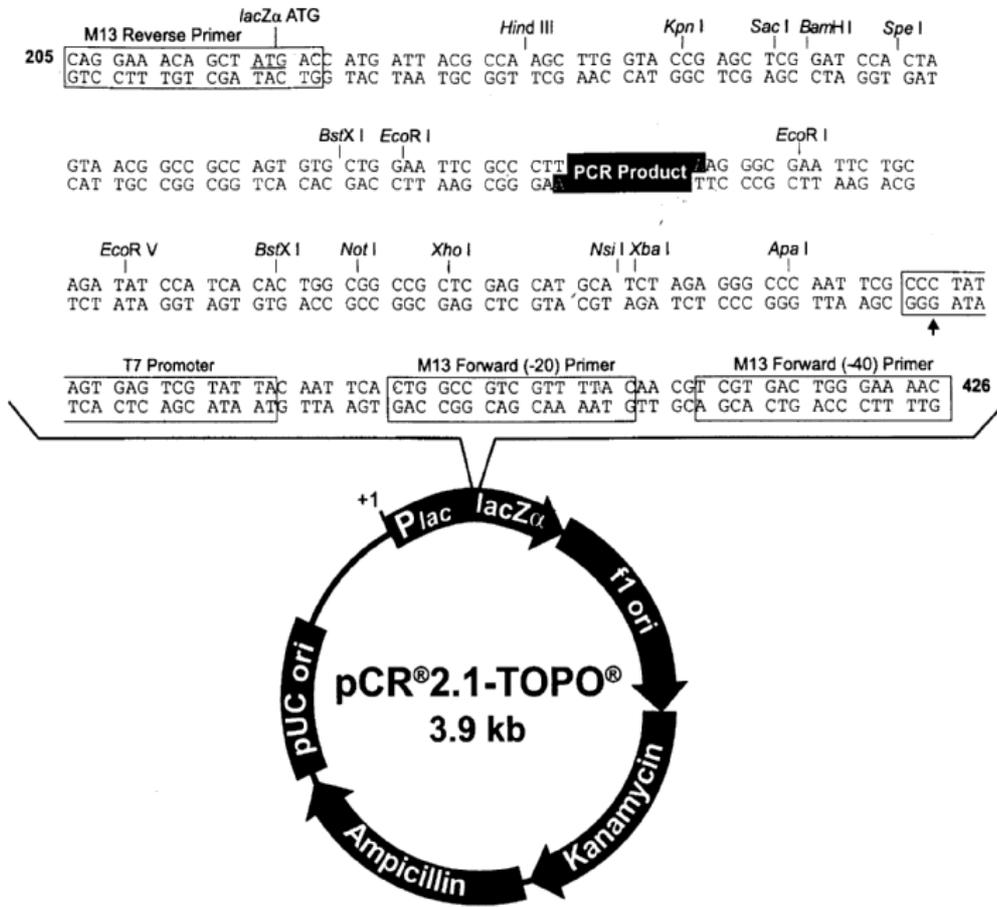
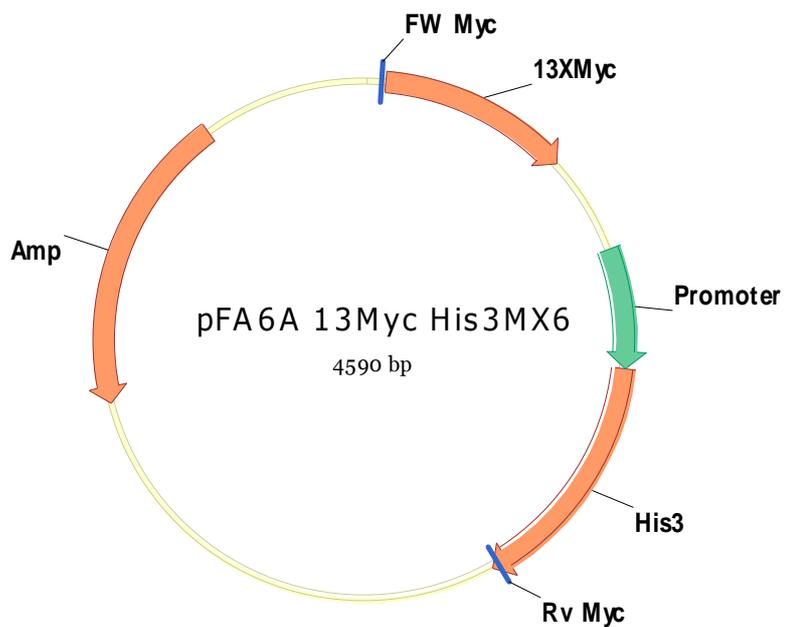
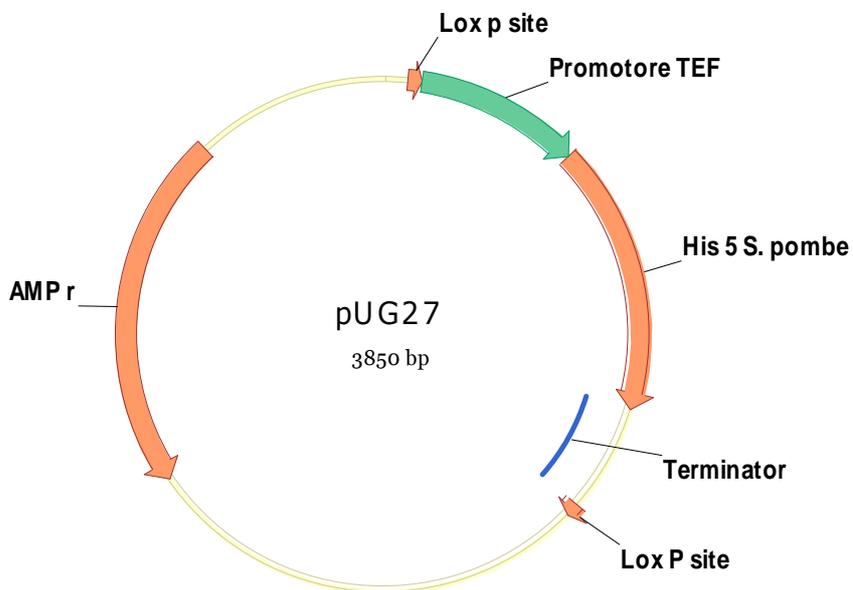


Figura 24. Mappa del plasmide pCR2.1-TOPO.



**Figura 25. Mappa di pFA6A-13Myc-His3MX6.**



**Figura 26. Mappa di pUG27.**

**Terreni di coltura****LB** (per 1 litro) :

Tryptone (Sigma) 10 g  
Yeast Extract (Sigma) 5 g  
NaCl (Sigma) 10 g  
pH 7.2  
per terreno solido agar (Sigma) 1.5%

**SOB** (per 1 litro):

Tryptone (Sigma) 20 g  
Yeast Extract (Sigma) 5 g  
NaCl (Sigma) 0.5 g  
KCl (Carlo Erba) 250 mM 10 mL  
pH 7.0

**SOC:**

SOB  
Glucosio (Sigma) 20mM

**YP** (per 1 litro):

Yeast Extract (Sigma) 10 g  
Tryptone (Sigma) 20 g  
Per terreno solido agar (Sigma) 20 g  
2% di glucosio (Sigma)

**Terreno SC selettivo per lievito** (per 1 litro):

Drop Out Mix (meno l'aa per cui si vuole selezionare il ceppo auxotrofico) 0.72 g  
Ammonio Solfato (Sigma) 5 g  
Yeast Nitrogen Base (Sigma) 1.7 g  
Per terreno solido agar (Sigma) 20 g  
pH a 6.2  
2% di glucosio (Sigma)

**Drop Out Mix**

0.8 g adenina, uracile, arginina, istidina, metionina, triptofano  
1.2 g tiroxina  
1.48 g lisina  
2 g fenilalanina  
2.4 g leucina  
8 g treonina

**GYT:**

Glicerolo (Sigma) 10%  
Yeast extract (Sigma) 0.125 %  
Tryptone (Sigma) 0.25%

**GTE:**

Glucosio (Sigma) 50mM  
EDTA (Sigma) 10mM  
Tris (Sigma) pH 8.0 25mM

**Elettroforesi di acidi nucleici:****Gel di agarosio**

Agarose (SeaKem) da 0.8% a 1.5%  
TAE 1X

**TAE 5X** (per 1 litro):

Tris Base (Sigma) 242 g  
Acido Acetico Glaciale (Sigma) 57.1 mL  
EDTA (Sigma) pH8 0.5M 100 mL

**Elettroforesi di proteine:****Gel di poliacrilammide 6.5%**

Resolving gel:  
Acrilammide:Bisacrilammide 29:1 6.5 ml  
Tris-Cl pH=8.8 8.1 ml  
SDS 20% 150 µl  
APS 0.1% 150 µl  
TEMED 15 µl  
H<sub>2</sub>O 15.105 ml  
Il volume finale è di 30 ml

Stacking gel:  
Acrilammide:Bisacrilammide 29:1 2.25 ml  
Tris-Cl pH=6.8 3.75 ml  
SDS 20% 75 µl  
APS 0.1% 75 µl  
TEMED 15 µl  
H<sub>2</sub>O 8.835 ml  
Il volume finale è di 15 ml

**Tampone di corsa**

Trizma base 3 g  
Glicina 14.4 g  
SDS 10% 10 ml  
Portare ad 1 l con acqua

**Tampone di trasferimento**

Trizma base 48 mM  
Glicina 39 mM  
SDS 0.0375%  
Metanolo 20%

**Rosso ponceau**

130 mg ponceau  
20 ml isopropanolo  
7,5 ml acido acetico  
a 50 ml con acqua  
Agitare fino a dissolvimento della polvere e filtrare

**Coomassie Brilliant blue**

250 mg Coomassie Brilliant Blue  
90 ml metanolo:acqua 1:1  
10 ml acido acetico  
sciogliere e filtrare

## 2.2. METODI

### Protocollo di PCR

Reagenti	Concentrazioni finali
DNA	1-10 ng
Buffer 10X	1X
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1.5 mM
dNTP 2.5 mM	200 μM
Primer Forward 2 μM	0.2 μM
Primer Reverse 2 μM	0.2 μM
Taq polymerase	0.05U/ μL

### Protocollo di PCR REAL TIME

Reagenti (ROCHE)	Concentrazioni finali
DNA	2 μl di DNA
Master mix 10x (10 mM MgCl <sub>2</sub> )	1X (10 mM MgCl <sub>2</sub> )
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2.08 mM
Primer Forward 2 μM	0.35 μM
Primer Reverse 2 μM	0.35 μM

Il termociclo utilizzato è il seguente:

1. 95°C 10' denaturazione
2. 95°C 15'' denaturazione
3. 60-65°C 10'' annealing
4. 72°C 20'' elongazione
5. 70-89°C 5'' acquisizione della fluorescenza per la quantificazione
6. ritornare allo step 2 da 35 a 50 volte
7. 95°C 0''
8. 65°C 15''
9. 95°C 0' acquisizione della fluorescenza per la curva di melting
10. 401°C 1' raffreddamento

**Primer usati in PCR**

SensAge2	5'-taccagcgaatattgtagggagaacgataagagg-3'
AntiTyr2	5'-ccacagaaagtctagggtctataaaattgattttgg-3'
AntiAat2	5'-ttgaagcatttatcagggtattgtctcatgagcgg-3'
SensTyr2	5'-ttcactgggcacttccaaaatcaatttatagacc-3'
SeqAge2	5'-aagagggccattttacaatt -3'
M13F	5'-ttgtaaacgacggccagt-3'
M13R	5'-caggaacagctatgacc-3'
HAfw	5'-acgcgtaaaaatgggcccgcacttttaccca-3'
HArw	5'-acgcgtcccatatggcactgagcagcgaat-3'
epitopoHA	5'-tctttaccatacagatgttcctgactatgcgggctatccctatgacgtcc cggactatgcaggatcttatccatacagcgtccagattacgctgctca-3'
Leoyea1	5'-ttcgtacgtacaatgctcc-3'
Leoyea2	5'-ccatgtcaatggccattttaa-3'
Sir3 fw	taaattacgccttttcgatggatgaagaattcaaaaataggactgcattc <u>ggatccc cgggttaattaa</u>
Sir3 rv	catgtgtacataggcatatctatggcggaagtgaaaatgaatgttggtggtcacatc <u>aaaacaccttgg</u>
Sir3 V1 rv	gagcccagtgaagcattat
Sir3 V4 fw	tggaatttcagcggatggt
Sir3-K2 fw	tatgggctaaatgtacgggc
LoxP-HIS- LoxP rv	tttctactgtcattggattttcattcgtaaaggcatcactccctagttg <u>aaagcttcgtac gctgcag</u>
LoxP-HIS- LoxP fw	tcttgagaccatagtagctttgtttgcccgaggatatttcagaaacctc <u>gtccact gagcggtcaga</u>
YNR076 fw	ttaactcaatcgtgctgg
H2 fw	ggggacaattcaagaatct
76A rv	ccataaaaatgagtcgctgc
76B rv	atcaaaatttctgggttcg

Per le coppie Sir3 e LoxP-HIS-LoxP, la porzione sottolineata è quella che si appaia rispettivamente ai plasmidi pFA6A-13Myc-His3MX6 e pUG27, la porzione non sottolineata indica la regione omologa al DNA genomico nel sito bersaglio della ricombinazione omologa.

### Primer usati in PCR REAL TIME

Nella tabella seguente sono riportati i primer usati in PCR real time con la regione di appaiamento sul genoma di *S. cerevisiae* valutata con *S. cerevisiae* WU-BLAST2 Search, (<http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/blast-sgd.pl>). Sono riportate le sequenze che producono allineamenti significativi (score 100, identity 100%).

Nome	Posizione*	Sequenza (5' → 3')
1 fw	CHR14 772360	ACAGGCAAAATAGCACGGAA
1 rv	CHR14 772676	CTTTCAGTGGATGATTGCAT
2 fw	CHR14 773965	TGGGCTCCTGTTGCTTATATTG
2 rv	CHR14 774341	CCCTTTGAGA ACTTCAAAAATTC
3 fw	CHR14 775149	TTTGATGGGCTCTGGTAAG
3 rv	CHR14 774811	TCCTTAATAGCGGCAATTGG
4 fw	CHR14 776370	TGGAGTTATACGGAAAGATC
4 rv	CHR14 776653	ACGTGAACCAATTAAGCTTG
5 fw	CHR14 779038	GATGAGCATTGTACAGCTTAC
5 rv	CHR14 778714	CTATGTTCTTTGTGTTAATTGTCAT
6 fw	CHR14 780667	CAGCATGCTTGGTATCTTATTGG
6 rv	CHR14 781019	ACAGCTCAATTGCGCTTCTTG
7 fw	CHR14 781927	TTAACTTCAATCGCTGCTGG
7 rv	CHR14 782261	ATACCGTCCTTGGATAGAGCC
8 fw	CHR14 782480	TTGTAGAAAAAGCGTGGACG
8 rv	CHR14 782595	GCAGCGACTCATT TTTTATGG
9 fw	CHR14 782653 CHR12 1063650	AAGAACAAGATTGCAGATCAGG
9 rv	CHR14 782761 CHR12 1063760	CGCAACCCAGAAATTTTGAT
10 fw	CHR14 783041	CGGTTAGCATATGGGAATGG
10 rv	CHR14 783160	AATATGCCACCTCACTGTCG
11 fw	CHR14 783521	CGGTCTATACCCTGAGCCATTTA
11 rv	CHR14 783318	TTATGTTTAGGTGATTTTGGTGG
12 fw	CHR14 783650	GCACACGAATGCTACAGTATATACC
12 rv	CHR14 783412	CGTATGTATTAAGAGCAGTTATACA
13 fw	CHR14 783763	TGGGTGAACAACAGTATAGTG
13 rv	CHR14 783991	CCCTGATAAACCTGTCTCTTA
14 fw	CHR14 784226	GTGGGTGTGGTGTGTGGTGT
14 rv	CHR14 784324- 784152	ACACCCACACACCCACAC
RDN 18 fw	CHR12 456234- 465371	CCGAGAGGTCTTGGTAATC
RDN 18 rv	CHR12 455982- 465119	AGTTCCTCTAAATGACCAAG
RDN NTS1 fw	CHR12 460781	ATATACGATGAGGATGATAGT
RDN NTS1 rv	CHR12 460521	TGAGCTTTTCTCAATTCTCTA
RDN NTS2 fw	CHR12 467799- 458662	AATAGTGAGGAACTGGGTAC
RDN NTS2 rv	CHR12 467571- 458434	GAAGTACCTCCCAACTACTTT
YCR012W fw	CHR3 138624	CCAACACCAAGACTGTCACTG
YCR012W rv	CHR3 138964	TGGCAATTCCTTACCTTCC
YDR050C fw	CHR4 556068	AAGGCCGGTAAGACTTTGGAT

YDR050C rv	CHR4 555746	TCAACAAATTCTGGCTTCAAA
YGR254W fw	CHR7 1001933	TATCGAAAAGAAGGCTGCCG
YGR254W rv	CHR7 1002226	TGGAAGTTTTTACCAGCGAA
YHR057C fw	CHR8 218480	TTTGAAGCATGATCGCAAGG
YHR057C rv	CHR8 218253	TCACCGCATTTTGCGATC
YHR174W fw	CHR8 452334	AAAGAAGGCTGCTGACGCTTT
YHR174W rv	CHR8 452633	TTGTCACCGTGGTGGAAAGTTT
YHR183W fw	CHR8 472160	GCTCAATCTGGTTGGAGAAAGT
YHR183W rv	CHR8 472424	CTTGGTATGTAGAGGAAGAAACATT
YKL060C fw	CHR11 326374	GTTGCAAGGAAGAAAAGCC
YKL060C rv	CHR11 326064	AGTGGTACGGAAAGTTTCCAA
YLR044C fw	CHR12 232717	ACCATGATCAGATGGGGCTT
YLR044C rv	CHR12 232432	CAACCAAGTTTTGTGGAGC
YPL079W fw	CHR16 407233	GACCGGTGTCGTCTACAACGTTACC
YPL079W rv	CHR16 407536	TTAAATGAAGTTTTCGTATGGAAC
YPR080W fw	CHR16 701593	TTGCGCTTCTTTCAACGCTA
YPR080W rv	CHR16 701953	CTTTTGAGCAGCCTTGGTAA

## TERMOCICLI

### MUT:

1. 95°C 5' denaturazione
2. 95°C 30''
3. 55°C 1' annealing
4. 72°C 1'30'' elongazione
5. step 2 per 39 volte
6. 72°C 10'
7. 4°C for ever
8. end

### HA

1. 95°C 5' denaturazione
2. 95°C 40''
3. 55°C 40'' annealing
4. 72°C 40'' elongazione
5. step 2 per 34 volte
6. 72°C 10'
7. 4°C for ever
8. end

### SeqYtop

1. 95°C 5' denaturazione
2. 95°C 40''
3. 47°C 1' annealing
4. 72°C 1' elongazione
5. step 2 per 34 volte
6. 72°C 10'
7. 4°C for ever

**SIR**

1. 95°C 5' denaturazione
2. 95°C 30''
3. 48°C 1' annealing
4. 72°C 1' 30'' elongazione
5. step 2 per 7 volte
6. 95°C 30'' denaturazione
7. 60°C 1' annealing
8. 72°C 1' 30'' elongazione
9. step 6 per 21 volte
10. 72°C 10'
11. 4°C for ever

**SCREENING**

1. 95°C 15' denaturazione
2. 95°C 40''
3. 45°C 40'' annealing
4. 72°C 2' elongazione
5. step 2 per 34 volte
6. 72°C 15'
7. 4°C for ever
8. end

**L-H-L**

1. 95°C 10' denaturazione
2. 95°C 30''
3. 54°C 40'' annealing
4. 72°C 2' elongazione
5. step 2 per 9 volte
6. 95°C 30'' denaturazione
7. 60°C 40'' annealing
8. 72°C 2' elongazione
9. step 6 per 24 volte
10. 72°C 10'
11. 4°C for ever

**Purificazione del DNA**

- Protocollo per Amicon Microcon-PCR Centrifugal Filter Devices

Diluire il prodotto di PCR fino a 500 uL con H<sub>2</sub>O sterile  
Aggiungere il volume totale alla resina senza toccare la membrana  
Centrifugare 1000 g 15' RT  
Spostare il filtro in una provetta da 1.5 mL pulita per la raccolta  
Aggiungere 20 uL di H<sub>2</sub>O ed invertire la resina  
Centrifugare 1000 g 2' RT  
Volume finale atteso: 18-20 uL

### Protocollo per il Topo TA Cloning Kit (Invitrogen)

- Trattamento del DNA con polimerasi con attività adenilante in 3': (la PLATINUM *pfx* DNA polymerase ha attività 3' e 5' esonucleasica, perciò aggiunge e rimuove adenina)

Reagente	Concentrazione finale
Buffer 10X	1X
dNTP 5uM	0.5 uM
Taq DNA polymerase Promega	0.5 U
DNA	400 ng
H2O	A volume (10 uL)

Incubare 72°C 15'

- Topo Cloning Reaction

Reagenti	Concentrazioni finali
DNA 3'-A	100 ng
Salt Solution	1 uL diluizione 1:4*
Topo vector	10 ng
H2O	A volume (6 uL)

\* Salt Solution stock:

MgCl<sub>2</sub> 0.06 M → 50 mM finale

NaCl 1.2M → 2.5 mM finale

Mescolare la reazione delicatamente

Incubare 5' RT

### Elettroporazione di E. coli Top 10 F'

- Protocollo per la preparazione delle cellule e di E. coli Top 10 F' elettrocompetenti:

Inoculare una colonia singola di E. coli Top 10 F' in 2 mL di terreno liquido LB +

Tetraciclina 15 ug/mL

Incubare 6h 37°C 170 rpm

Diluire la coltura a 50 mL con terreno LB + antibiotici fresco

Incubare 16 h 37°C 170 rpm

Inoculare 25 mL della coltura in 475 mL di terreno LB + antibiotici

Incubare a 37°C 170 rpm fino a densità ottica 0.35-0.4

Incubare la beuta in ghiaccio 15'-30' e agitarla di tanto in tanto

Centrifugare le cellule 1000 g 15' 4°C

Eliminare il supernatante

Risospendere il pellet in 500 mL di H<sub>2</sub>O (4°C) (50 mL per 10 falcon 50)

Centrifugare 1000 g 20' 4°C

Eliminare il supernatante

Risospendere il pellet in 250 mL di glicerolo (Sigma) 10% (25 mL per 10 falcon 50)

Centrifugare 1000 g 20' 4°C

Eliminare il supernatante

Risospendere il pellet in 10 mL di glicerolo (Sigma) 10% (1 mL per 10 falcon 50)

Centrifugare 1000 g 20' 4°C

Eliminare tutto il supernatante

Risospendere il pellet in 1 mL totale di GYT freddo (+4°C) agitando delicatamente,

Aliquotare 40 uL di cellule per ogni tubo da 1.5 mL

Conservare subito a -80°C

- Protocollo per l'elettroporazione di E. coli Top 10 F'

Preraffreddare le cuvette a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Kartel)

Aggiungere ad un'aliquota di cellule appena scongelate da  $-80^{\circ}\text{C}$  una quantità di DNA fra 10 pg e 25 ng in volumi di 1-2 uL

Incubare 10' RT

Elettroporare a 1.8 V (BioRad)

Risospingere velocemente le cellule in 1 mL di terreno SOB

Incubare 1h  $37^{\circ}\text{C}$

Piastrare 100 uL su piastre SOB Agar +  $\text{MgSO}_4$  20mM + Ampicillina 50 ug/mL

Centrifugare i restanti 900 uL 1' 20000 g

Eliminare il sopranatante e risospingere le cellule in 100 uL di SOC

Piastrare tutto su piastre SOB Agar +  $\text{MgSO}_4$  20mM + Ampicillina 50 ug/mL

Incubare 16 h  $37^{\circ}\text{C}$

### PCR Colony

Stemperare la colonia di E. coli in 20 uL di  $\text{H}_2\text{O}$  e ristisciarla su LB + Ampicillina 50ug/mL + Tetraciclina 15 ug/mL

Reazione di PCR con 5 uL /20 di  $\text{H}_2\text{O}$  in cui si è precedentemente stemperata la colonia

### Estrazione di DNA plasmidico

- Protocollo per estrazione di DNA plasmidico (Mini Prep) da batteri

Inoculare una singola colonia batterica in 5 mL di LB + Ampicillina 50 ug/mL

Incubare 16 h  $37^{\circ}\text{C}$  170 rpm

Centrifugare 1.5 mL della coltura in provetta da 2 mL 3' a 18000 g

Eliminare il supernatante

Centrifugare altri 1.5 mL di coltura nella stessa provetta da 2 mL 3' a 18000 g

Eliminare il supernatante

Aggiungere 100 uL GTE (Glicerol Tris EDTA)

Aggiungere 200 uL di una miscela di NaOH 0.2 M e SDS 1%

Mescolare 10' per la rottura delle membrane

Aggiungere 150 uL di KOAc 3 M pH 5.0 ( $+4^{\circ}\text{C}$ )

Mescolare delicatamente per inversione 10'

Incubare in ghiaccio 5' per far precipitare solo il DNA genomico

Centrifugare 17000 g 5'  $4^{\circ}\text{C}$

Recuperare il supernatante

Aggiungere 5 uL RNAasi A 10mg/mL Sigma

Incubare 1 h  $37^{\circ}\text{C}$

Aggiungere 450 uL di Phe/ $\text{CH}_3\text{Cl}$  (Sigma)

Agitare vigorosamente 30''

Centrifugare 3'  $4^{\circ}\text{C}$  15000 g

Trasferire il supernatante in una nuova eppendorf

Aggiungere 450 uL di  $\text{CH}_3\text{Cl}$  (Sigma)

Agitare vigorosamente 30''

Centrifugare 3'  $4^{\circ}\text{C}$  15000 g

Trasferire il supernatante in una nuova eppendorf

Aggiungere 900 uL EtOH 100%

Incubare almeno 1 h  $-20^{\circ}\text{C}$

Centrifugare 30'  $4^{\circ}\text{C}$  20000 g

Lavare con EtOH 70%

Centrifugare 15'  $4^{\circ}$  20000 g

Eliminare il supernatante e far seccare il pellet

Risospingere in  $\text{H}_2\text{O}$

- Protocollo per estrazione di DNA plasmidico da batteri (Qiagen)

Inoculare una singola colonia in 2 mL (x 2) di terreno LB + Ampicillina 50 ug/mL  
Incubare 6 h 37°C 170rpm  
Aggiungere 1 2 mL di coltura a 48 mL di terreno LB + Ampicillina fresco (x 2)  
Incubare 16 h 37°C 170 rpm  
Centrifugare 100 mL totali (in 2 falcon da 50 mL) 6000 g 15' 4°C  
Eliminare il supernatante  
Risospendere i pellet in 4 mL di Buffer P1 (+4°C) con RNAasi A 10mg/mL Sigma  
Agitare vigorosamente  
Aggiungere 4 mL di Buffer P2  
Mescolare delicatamente 4-6 volte –non agitare vigorosamente-  
Incubare RT 5' –non oltre-  
Aggiungere 4 mL di Buffer P3  
Mescolare delicatamente 4-6 volte  
Incubare in ghiaccio 15'  
Centrifugare 10600 g 30' 4°C  
Recuperare il supernatante  
Ricentrifugarlo 10600 g 15' 4°C  
Recuperare il supernatante  
Equilibrare la QIAGEN-TIP 100 con 4 mL di Buffer QBT  
Far svuotare la colonna per gravità  
Mettere il supernatante in colonna e lasciarlo eluire per gravità  
Lavare la colonna con 2 x 10 mL di Buffer QC  
Eluire il DNA con 5 mL di Buffer QF  
Precipitare il DNA con isopropanolo, mescolare  
Centrifugare 15000 g 30' 4°C  
Lavare il pellet con EtOH 70%  
Centrifugare 15000 g 10' 4°C  
Eliminare il supernatante e far seccare il pellet  
Risospendere in 200 uL di H<sub>2</sub>O

- Protocollo per estrazione di DNA plasmidico da lieviti

Inoculare una singola colonia di lievito in 10 mL di terreno selettivo URA-  
Incubare 30°C 40 h 170 rpm  
Centrifugare la coltura 800 g 10' RT  
Eliminare il supernatante  
Lavare con 10 mL H<sub>2</sub>O sterile  
Centrifugare 800 g 10' RT ed eliminare il supernatante  
Risospendere in 800 uL di soluzione: LiCl (Sigma) 2.5M, Tris 50mM pH8.0,  
Na<sub>2</sub>EDTA (Sigma) 62.5mM, Triton X-100 (Sigma) 4%  
Aggiungere lo stesso volume di glass bits (Sigma)  
Agitare vigorosamente 2'  
Centrifugare 2' RT 18000 g  
Recuperare il supernatante  
Aggiungere 4 uL RNAasi A 10mg/mL Sigma  
Incubare 5' 37°C  
Aggiungere Proteinasi K 0.1 mg/mL (Invitrogen)  
Incubare 60' 60°C  
Aggiungere ugual volume di fenolo: cloroformio (Sigma)  
Centrifugare 1600 g 3' 4°C  
Recuperare la fase superiore  
Ripetere l'estrazione con fenolo: cloroformio  
Aggiungere ugual volume di cloroformio (Sigma)  
Centrifugare 1600 g 3' 4°C  
Recuperare la fase superiore  
Precipitare con NaOAc 3M pH5.2 (1/10 vol) ed EtOH 100% (2.5 volte)

**Digestione enzimatica**

- Digestione con AGE I

Reagente	Concentrazione finale
Buffer NEB1 BioLabs 10X	1X
Spermidina Sigma 6.3 mM	0.1 mM
Enzima AGE I BioLabs 5U/ uL	1U/100 ng DNA

Incubare 16 h 37°C

- Digestione con AAT II

Reagente	Concentrazione finale
Buffer NEB4 BioLabs 10X	1X
Enzima AAT II BioLabs 20U/ uL	1U/250 ng DNA

Incubare 8 h 37°C

- Digestione con Hind III

Reagenti	Concentrazione finale
Buffer R+ (Fermentas) 10X	1X
Enzima Hind III (Fermentas) 10U/ uL	1U/100ug DNA

Incubare 3 h 37°C

- Digestione con SAC I

Reagenti	Concentrazione finale
Buffer NEB1 (BioLabs) 10X	1X
Enzima Sac I (BioLabs) 20U/ uL	1U/100ug DNA

Incubare 3 h 37°C

- Digestione con Mlu I

Reagenti	Concentrazione finale
Buffer NEB3 (BioLabs) 10X	1X
Enzima Mlu I (BioLabs) 10U/ uL	1U/500ug DNA

Incubare 3 h 37°C

## Defosforilazione del 5' fosfato

Defosforilazione con Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP)

Reagenti	Concentrazione finale
Buffer NEB4 BioLabs 10X	1X
Enzima CIP BioLabs 10U/ uL	0.5U/1 ug DNA

Incubare 60' 37°C

## Ligazione

Reazione di legazione con T4 DNA Ligasi:

Pre-incubare vettore ed inserto a 50°C 5'

Utilizzare opportuni rapporti molari dei frammenti di DNA da ligare

Reagenti	Concentrazione finale
Buffer T4 BioLabs 10X	1X
Enzima T4 DNA Ligasi 10U/ uL	70U/100 ng DNA vettore

Incubare on 16°C

## Elettroeluizione di DNA da gel d'agarosio

- Pretrattamento delle membrane da dialisi (dialysis tubing Sigma)

Rimuovere la glicerina lavando i tubi con H<sub>2</sub>O in agitazione per 3-4 h

Rimuovere i componenti sulfurei con 0,3% (peso/volume) di solfito di sodio a 80°C 1'

Lavare con H<sub>2</sub>O calda (60°C) 2' seguita da acidificazione con 0,2% (volume/volume) di acido solforico

Risciacquare con H<sub>2</sub>O calda per rimuovere l'acido

Riporre a RT

Bollire le membrane 10' in 2% di NaHCO<sub>3</sub> (Sigma) e EDTA (Sigma) 1 mM pH 8.0

Lavarle con H<sub>2</sub>O distillata

Bollirle 10' in EDTA 1 mM pH 8.0

Lasciarle raffreddare in H<sub>2</sub>O distillata (sommerse)

Conservarle a +4°C

- Elettroeluizione

Chiudere la membrana da dialisi con una clip ed inserire la fetta d'agarosio tagliata

Aggiungere un certo volume di TAE 1X (proporzionale alle dimensioni della fettina di gel)

Chiudere l'altra estremità della membrana con la clip evitando le bolle d'aria

Corsa in tampone TAE 1X a 4-5 V/cm per 2-3 h

Invertire la polarità 1'

Rimuovere il tampone TAE dalla membrana e lavarla con del tampone fresco ( 100 uL)

Precipitazione del DNA elettroeluito con NaOAc 3M pH 5.2 (1/10 vol) ed EtOH 100% (2.5 VOL)

Colorazione con EtBr delle fettine di gel per verificare l'eluizione

**Trasformazione di lievito JEL 1  $\Delta$  top1 con sali (litio acetato)**

Inoculare una colonia singola in 10 mL di YP liquido  
Incubare 16 h 30°C 170 rpm  
Leggere la densità ottica finché non diventa 1  
Controllare i lieviti al microscopio ottico  
Centrifugare i 10 mL di coltura 800 g 5' RT  
Eliminare il surnatante  
Lavare le cellule e pelletate con 1 mL di soluzione A  
Centrifugare 800 g 5' RT  
Eliminare il surnatante  
Risospendere le cellule in 1/100 del volume iniziale (100  $\mu$ L) di soluzione A  
Aggiungere 100  $\mu$ g di DNA Salmon Sperm (prebollito 5') Sigma  
Aggiungere per ogni trasformazione 50 ng DNA  
Aggiungere 0.7 mL di soluzione C  
Risospendere bene le cellule  
Incubare 1 h 30°C 170 rpm e invertire i tubi di tanto in tanto  
Heat Shock in bagno caldo a 42°C 15'  
Centrifugare 12000 g 5'' RT  
Aspirare il supernatante con la pipetta  
Lavare il pellet con 1 mL di TE 1X e risospendere bene le cellule  
Centrifugare 12000 g 5'' RT  
Aspirare il supernatante  
Risospendere in 100  $\mu$ L TE 1X e piastrellare 100  $\mu$ L su terreno selettivo URA- agar  
Incubare 30°C

**Soluzione A**

LiAc (Fluka) 0.1 M  
Tris HCl 10mM pH 7.5-8.0  
Na<sub>2</sub>EDTA (Sigma) 1mM

**Soluzione C**

PEG 4000 40% Sigma  
LiAc (Fluka) 0.1 M  
Tris HCl 10mM pH 7.5-8.0  
Na<sub>2</sub>EDTA (Sigma) 1mM

**TE 1X**

Tris HCl 10mM pH 7.5  
Na<sub>2</sub>EDTA (Sigma) 1mM

**Estrazione e purificazione di acidi nucleici da lievito**

- Estrazione di DNA genomico

Inoculare una singola colonia in 5 ml di terreno YP 2% di glucosio e crescere O/N a 30°C 170 rpm  
Raccogliere i lieviti centrifugando a 800 g per 5 minuti a temperatura ambiente  
Risospendere il pellet in 1 ml di acqua  
Centrifugare a 800g per 5 minuti  
Risospendere in 500  $\mu$ l di Lysis buffer (100 mM Tris pH=8.0, 50 mM EDTA, 1% SDS)  
Aggiungere un uguale volume di glass beads acid wash (Sigma)  
Agitare vigorosamente per 2 minuti  
Recuperare la fase liquida  
Aggiungere 275  $\mu$ l di sodio acetato 3 M pH=5.2  
Incubare 5 minuti a 65°C e poi 5 minuti in ghiaccio

Aggiungere 500 µl di cloroformio, agitare, centrifugare alla massima velocità e recuperare la fase superiore  
 Aggiungere 1 ml di isopropanolo  
 Incubare 5 minuti a temperatura ambiente, centrifugare alla massima velocità 5 minuti  
 Lavare il pellet con etanolo al 70%, essiccare e risospendere in 50 µl di acqua  
 Aggiungere Rnasi alla concentrazione di 0.4 mg/ml  
 Incubare 3 ore a 37°C  
 Aggiungere 450 µl di TE pH=7.5 (Tris HCl 10mM pH 7.5, Na<sub>2</sub>EDTA (Sigma) 1mM)  
 Aggiungere 500 µl di cloroformio, agitare vigorosamente, centrifugare alla massima velocità per 1'  
 Recuperare la fase superiore  
 Aggiungere 50 µl di sodio acetato 3 M pH=7.5  
 Aggiungere 1 ml di etanolo 100%  
 Incubare a -20°C per almeno 30 minuti  
 Centrifugare alla massima velocità per 30 minuti 4°C  
 Eliminare fase liquida e lavare il pellet con 100 µl di etanolo al 70%  
 Centrifugare alla massima velocità per 25 minuti 4°C  
 Essiccare il pellet e risospenderlo in 20 µl di acqua

- Estrazione di RNA totale

Inoculare una singola colonia di lievito Jel1Δtop1 + plasmide (pCC10, pCC10AR7, YCp50) in 10 mL di terreno URA- liquido  
 incubare 16 h 30°C 170 rpm  
 diluire riportando la densità ottica a 260 nm pari a 0.05 in 250 mL  
 incubare la coltura 10 h 30°C 170 rpm  
 raccogliere le cellule centrifugando 800 g 5' RT  
 eliminare il supernatante  
 conservare il pellet a -80°C  
 risospendere il pellet (da 250 mL di coltura) in 12 mL di AE Buffer  
 aggiungere 800 uL di SDS (BioRad) 25%  
 aggiungere 12 mL di fenolo acido (pH 4.5) (Sigma) e mescolare bene  
 incubare 65°C 10' e agitare vigorosamente ogni minuto  
 incubare 5' in ghiaccio  
 centrifugare 15' 4°C 12000 g  
 recuperare la fase superiore  
 aggiungere 15 mL di cloroformio e mescolare bene  
 centrifugare 10' 4°C 1800 g  
 recuperare la fase superiore (10 mL)  
 aggiungere 1/10 vol (1 mL) di NaOAc 3M pH5.2 e 1 vol (11 mL) di isopropanolo  
 centrifugare 40' 4°C 12000 g  
 lavare con EtOH 70% risospendendo il pellet  
 centrifugare 20' 4°C 12000 g  
 eliminare il supernatante e seccare il pellet senza scaldarlo

AE Buffer:

NaOAc pH5.2 50 mM  
 EDTA (Sigma) 10mM

SDS 25%:

Sciogliere 12.5 g di SDS (BioRad) in 50 mL H<sub>2</sub>O scaldando a 68°C

Trattamento con DNAasi I:

Risospendere il pellet di RNA secco in 180 uL H<sub>2</sub>O  
 Aggiungere 20 uL Buffer DNAase (Fermentas)  
 Aggiungere 2 uL DNAase I (Fermentas) 1U/ uL  
 Incubare 37°C 15'  
 Estrazione fenolo:cloroformio

Aggiungere 200 uL di fenolo:cloroformio  
 Agitare vigorosamente 30''  
 Centrifugare 1' RT 20000 g  
 Recuperare la fase superiore  
 Aggiungere 200 uL di cloroformio  
 Agitare vigorosamente 30''  
 Centrifugare 1' RT 20000 g  
 Recuperare la fase superiore  
 Precipitazione con NaOAc ed EtOH 100%

- Purificazione di Poly (A)+ RNA da RNA totale (Oligotex mRNA Spin-Column Kits, Qiagen)

Riscaldare Oligotex Suspension a 37°C , mescolarla, riporla a RT  
 Riscaldare a 70°C Buffer OEB  
 Se il Buffer OEB forma un precipitato sul fondo, dissolverlo riscaldando a 37°C e riporlo a RT  
 Determinare la corretta quantità di RNA di partenza  
 Risospendere 0.500 mg di RNA totale in provetta da 1.5 mL RNAase free da 1.5 mL in 500 uL di H<sub>2</sub>O RNAase free  
 Aggiungere 500 uL Buffer OEB  
 Aggiungere 45 uL Oligotex Suspension  
 Mescolare  
 Incubare il campione a 70°C 3'  
 Incubarlo a RT 10'  
 Centrifugare il complesso Oligotex:mRNA 14000-18000 g 2' RT  
 Rimuovere molto delicatamente il supernatante con la pipetta  
 Risospendere il pellet Oligotex:mRNA in 400 uL Buffer OW2 mescolando vigorosamente o pipettando  
 Introdurre il campione in una spin column piccola, posta in provetta da 1.5 mL RNAase free  
 Centrifugare 3' 4000 g RT  
 Trasferire la spin column in una provetta da 1.5 mL RNAase free pulita  
 Aggiungere 400 uL Buffer OW2 alla colonnina  
 Centrifugare 1' 14000-17000 g RT  
 Eliminare l'eluato  
 Trasferire la spin column in una nuova provetta da 1.5 mL RNAase pulita  
 Aggiungere 80 uL Buffer OEB preriscaldato a 70°C alla colonna pipettando su e giù per risospendere la resina  
 Centrifugare 1000 g 2' RT  
 Riscaldare l'eluato a 70°C 1'  
 Raggiungere lo stesso eluato alla colonna, rispipettando e ripetere l'eluazione per altre 4 volte

### Retrotrascrizione dell'RNA a cDNA

- Retrotrascrizione dell'RNA totale a cDNA (cDNA Cycle Kit, Invitrogen)

Risospendere 5 ug di RNA totale oppure 0.5 ug di mRNA in 11.5 uL H<sub>2</sub>O DEPC  
 Aggiungere 1 uL di Primer OLIGO d(T)18-20 5 ug/ uL  
 Incubare 65°C 10'  
 Incubare 2' RT  
 centrifugare tutti i componenti della miscela  
 Aggiungere 1 uL RNAase Inhibitor  
 Aggiungere 4 uL RT Buffer 5X  
 Aggiungere 1 uL dNTP 100mM  
 Aggiungere 1 uL Sodio Pyrophosphato 80mM  
 Aggiungere 0.5 uL Reverse Transcriptasi AMV

Mescolare bene ed incubare a 42°C 60'  
 Incubare 2' a 95°C  
 Aggiungere RNAase A (Sigma) 10ug/mL finale  
 Incubare 15' 37°C  
 Aggiungere SDS (BioRad) 0.1% finale  
 Incubare 30' 55°C  
 Aggiungere 1 uL EDTA (Sigma) 0.5M pH8.0  
 Aggiungere 22 uL fenolo:cloroformio  
 Centrifugare 3' 7000 g  
 Recuperare la fase acquosa  
 Aggiungere 22 uL Ammonio Acetato ed 88 uL EtOH  
 Precipitare e seccare il pellet  
 Risospendere in 20 uL H<sub>2</sub>O

### Retrotrascrizione con ammino-allil dUTP e coupling al NSH-Cyanine Dye

Procedura originale: [www.microarrays.org/protocols.html](http://www.microarrays.org/protocols.html)

I seguenti protocolli sono in gran parte derivati dal Cold Spring Harbor Microarray Corse manual. Fra gli autori sono inclusi: H. Bennett, J. De Risi, V. Iyer, A. Alizadeh, J. Lieb ed altri membri del laboratorio Brown e De Risi. I protocolli sono stati perfezionati da Keith Morneau e Duccio Cavalieri al Center for Genomics Research.

- Trascrizione inversa (SuperScript II Rnase H Reverse Transcriptase, Invitrogen)

Risospendere 3 ug di Poly (A)-RNA o 50 ug di RNA totale in 14.5 uL di H<sub>2</sub>O DEPC  
 Aggiungere 1 uL Oligo dT/pdN6 (5ug/ ul ciascuno)  
 Mescolare in tubi da PCR 0.2 mL RNAase free  
 Incubare la miscela primer/RNA 70°C 10'  
 Incubare in ghiaccio 10'  
 Preparare la mix per la sintesi del cDNA aggiungendo  
 6 uL/ rxn Buffer 5X  
 0.8 uL/ rxn 50X aa-dUTP/ dNTP  
 3 uL/ rxn DTT 0.1M  
 3 uL/ rxn H<sub>2</sub>O DEPC  
 Aliquotare 12 uL di mix per ciascuna miscela RNA/ primer  
 Aggiungere 3 uL di Superscript II/ rxn  
 Incubare a 42°C 2 h

La miscela di primer pdN6 è ordinata come NNNNNN da Gibco/BRL

Gli Oligo dT sono una miscela di dT 18-20 da Gibco/BRL

Ammino-allil dUTP è ordinato da Sigma in aliquote da 1 mL e dissolto in 20 uL H<sub>2</sub>O DEPC e miscelato con 30 uL di dATP, dGTP, dCTP 100mM e 12 uL di dTTP 100mM; il rapporto finale di aa-dUTP e dTTP è 3:2.

- Idrolisi basica di RNA

Aggiungere ad ogni reazione 10 uL NaOH (Carlo Erba)1N  
 Aggiungere 10 uL EDTA (Sigma) 0.5 M  
 Mescolare bene  
 Incubare 7' a 65°C  
 Neutralizzare ogni reazione con 25 ul HEPES (Sigma) 1M pH7.5  
 Mescolare bene  
 Porre in ghiaccio fino al cleanup o conservare a -20°C fino a 2 settimane

- Cleanup

I trascritti ottenuti dalla reazione di trascrizione inversa devono essere purificati e tutto il Tris dev'essere rimosso prima del coupling al NSH-cyanine dye.

Marcare ogni microcon Y-30 e pesare ciascun filtro in mg (di solito 635)

Diluire la reazione neutralizzata a 500 uL con H<sub>2</sub>O nucleasi free

Aggiungere la soluzione al microcon-30

Centrifugare 10000 g 8' RT

Rimuovere l'eluato

Aggiungere 470 uL H<sub>2</sub>O nucleasi free e ricentrifugare 10000 g 8' RT

Rimuovere l'eluato e ripetere il lavaggio

Centrifugare i microcon finché la differenza di peso non è fra 18 e 25 mg

Raccogliere (invertendo la colonnina in una nuova eppendorf) centrifugando 1900 g 5' RT

Il volume finale dovrebbe essere di 10-13 uL

- Coupling

L'ammina dell'ammino-allil gracile deve essere libera dalle basi prima del coupling all'estere dell'N idrossi-succinammide del colorante cyanine.

Ai 10 uL di campione purificato, aggiungere 1.5 uL di NaHCO<sub>3</sub> 1M pH9.0 (la concentrazione finale non dev'essere minore di 50 mM)

Aggiungere la soluzione basica del campione ad un'aliquota di NHS cyanine dye

Incubare al buio 1 h RT

L'NHS-estere del colorante cy3 e cy5 è acquistato da Amersham. In ciascuna confezione, ci sono 5 aliquote di colorante. Ciascuna di esse dev'essere aliquotata in 10 parti, essendo disciolta in 20 uL DMSO e aliquotata in 10 provetta da 1.5 mL RNAase free. Le aliquote devono essere poi concentrate con la speed-vac a bassa temperatura e conservate a +4°C fino all'uso.

- Purificazione (Qiagen PCR Purification Kit)

Purificare singolarmente i campioni Cy3 e Cy5

Aggiungere 70 uL H<sub>2</sub>O a ciascuna reazione di marcatura

Aggiungere 50 uL PB Buffer

Aggiungere la miscela alla colonna Qiaquick

Centrifugare 18300 g 1' RT

Rimuovere il supernatante con la pipetta

Aggiungere 700 uL PE Buffer

Centrifugare 18300 g 1' RT

Rimuovere il supernatante con la pipetta e ripetere il lavaggio

Aspirare il supernatante e centrifugare 18300 g 1' RT per asciugare la colonnina

Trasferire in provetta da 1.5 mL RNAase free pulite

Aggiungere 30 uL EB Buffer al filtro

Incubare 1' RT

Centrifugare 18300 g 1' RT

Ripetere lo step di eluizione con altri 30 uL EB Buffer

Segnare i microcon-30 e pesarne il filtro

Mettere insieme i campioni Cy3 e Cy5 s uL filtro

Centrifugare 10000 g 2' RT

Centrifugare finché la differenza in peso non è di circa 55 mg

Raccogliere (invertendo la colonnina in un nuovo tubo) centrifugando 1900 g 5' RT

Assicurarsi che il volume non sia mai minore di almeno 50 uL, se non lo è portarlo a 50 con H<sub>2</sub>O

## Ibridazione ed acquisizione dati

- Preparazione all'ibridazione

Aggiungere al campione 6 uL SSC 20X  
Aggiungere 3 uL Poly(A) 10ug/ uL  
Aggiungere 0.96 uL HEPES (Sigma) 1M pH7.0  
Bagnare il filtro Millipore 0.45 um con 10 uL H2O  
Centrifugare 18300 g 1' RT  
Aspirare il supernatante  
Aggiungere il campione al filtro  
Centrifugare 18300 g 1' RT  
Rimuovere il filtro  
Aggiungere 0.9 uL SDS (BioRad) 10%  
Lavare accuratamente la camera di ibridizzazione con SDS  
Porci sopra il vetrino\*, con il numero voltato verso il basso  
Apporre il coprivetrino, con le strisce bianche rivolte verso il basso

SSC 20X:

Dissolvere 175.3 g NaCl (Sigma) e 88.2 g Na3 Citrate (C6H5O7-Na3 Sigma) in 800 uL H2O  
Aggiustare il pH a 7.0 con qualche goccia di HCl 14N  
Portare a volume con H2O (1 litro)  
Sterilizzare in autoclave  
La concentrazione finale dev'essere NaCl 3M e Na3 citrate 0.3M

\*I vetrini a cDNA sono stati forniti da Duccio Cavalieri (Harvard University, Boston)

- Ibridazione

Mettere il campione in tubi da PCR da 0.2 mL  
Riscaldarlo a 100°C 2'  
Spinnare il campione prima dell'uso  
Iniettere lentamente sul vetrino il campione, in volume di almeno 50 uL, ad una estremità del vetrino stesso e continuare ad applicarlo dall'altra parte, essendo sicuri di non lasciare bolle d'aria  
Aggiungere 100 uL SSC 3X a ciascuno dei pozzetti della camera di ibridizzazione  
Incubare la camera a 65°C in bagnetto caldo, dopo averlo posto in piano  
Lasciare procedere l'incubazione 16 h (14-16 h)

- Lavaggi post ibridazione

Rimuovere la camera di ibridizzazione delicatamente dal bagnetto  
Rimuovere il vetrino dalla camera usando della pinze  
Invertire il vetrino nella soluzione 1: 387 mL Milli-Q Water, 12 mL SSC 20X, 1 mL SDS (Sigma) 10% per far scivolare il coprivetrino  
Lavare il vetrino nella soluzione 1 immergendolo su e giù 40 volte  
Lavare il vetrino nella soluzione 2: 399 mL Milli-Q Water, 1 mL SSC 20X immergendolo su e giù 40 volte  
Far asciugare il vetrino in centrifugare ( 2' 450 g)

- Rivelazione con GenePix 4000a Microarray Scanner

Inserire il chip con la parte ibridizzata verso l'alto nello scanner  
Settare, nel software GenePix Pro 3.0, il fotomoltiplicatore nel canale 635nm (Cy5) e 532nm (Cy3)  
Avviare una "preview scan" per determinare la localizzazione degli spot e l'intensità di ibridizzazione

Mentre l'immagine è rivelata, "istogramma" permette di osservare in tempo reale le intensità relative di entrambi i canali. L'istogramma è funzione dell'accuratezza del settaggio del fotomoltiplicatore  
 L'istogramma dev'essere settato : Image both; X-axis Fullscale; Y-axis Log Axis On Fullscale  
 Osservando l'istogramma, aggiustare il fotomoltiplicatore in modo che il rapporto fra le intensità dei due laser sia 1.0 e ci siano al massimo 2 spot saturi per blocco  
 Una volta determinata l'area di scansione, identificare la "scan area" sull'array intero  
 Avviare "data scan"  
 Salvare l'immagine acquisita con open/save e selezionare save images (TIFF files)

- **Analisi**

Aprire le immagini da analizzare con open/save e selezionare open images (TIFF files)  
 Costruire la griglia opportuna: 20 colonne e 21 righe per ognuno dei 16 blocchi. Il diametro degli spot è di 100nm, la spaziatura fra le colonne e le righe all'interno di ciascun blocco è di 200nm, la distanza fra i blocchi lungo le due direzioni è di 500nm  
 Assegnare con "load array list" il nome dei geni agli spot mediante l'uso del GALfile (si tratta di una matrice in cui al nome di ogni gene sono assegnate coordinate spaziali sull'array. Il file ha il seguente formato: block, row, column, ID)  
 Eliminare gli spots saturati (bianchi) = Flag  
 Correggere le aree per gli spot di dimensioni  $> 0$  o  $<$  rispetto al circoletto della griglia  
 Premere tasto "Analyze" che genera sia lo scatter plot relativo alle intensità di Cy3 e Cy5, che una tabella di dati. Salvare la tabella dei dati (file gpr che può essere aperto in xls)

- **Normalizzazione**

Salvare i risultati in foglio xls (selezionare tutto, copia, inserire nuovo foglio di lavoro, incolla speciale = valori, dare nome al nuovo foglio es. dati normalizzati)  
 Eliminare righe da 1 a 29 o 31 nel caso si abbia GenePix Pro 4.0: Comunque fermarsi fino a che si incontra le seguenti caselle: Block, column, row, name  
 Eliminare colonne ABC (block, column, row)  
 Eliminare tutte le colonne ad eccezione di: Name, ID, F532 Median - B532, F635 Median - B635 e Flags  
 Ordina dati con riga di intestazione per ID crescente  
 Eliminare i blank e gli empty  
 Ordina dati con riga di intestazione ID decrescente (solo per lievito)  
 Solo per vetrino di *S cerevisiae* togliere i 12 valori senza intestazione (sono in fondo)  
 Ordina dati con riga di intestazione Flags crescente  
 Eliminare i valori negativi (-50 e -100)  
 In colonna F : =media (C2:C6000 o fino in fondo), invio [ media dell'F635 median-B (Cy5)]  
 In colonna G : =media (D2:D6000 o fino in fondo), invio [ media dell'F532 median (Cy3)]  
 Cy3/Cy5 in colonna H = Fattore di normalizzazione (FN)  
 Cy5 normalizzato : = FN \* F635 median (C2....)  
 Fold change : Cy5 norm/ F532 median  
 Fold change: F532 median /Cy5 norm (Il valore di Fold change che interessa dipende chiaramente dalla marcatura, ad esempio se il controllo è stato marcato con Cy3 e il campione sperimentale con Cy5, il valore di Fold change sarà Cy5/Cy3)  
 Copiare intero foglio di xls in nuovo foglio di lavoro dove lasciare solo le colonne : Name, ID, Fold Change  
 Ordinare per Cy5 o Cy3. Per i valori  $< 0.50$  fare il negativo dell'inverso ovvero nel caso del valore  $0.45 = - 1/0.45$ . Ordina per fold change in ordine decrescente.  
 Salvare il file

- **Repliche**

Nel caso in cui si abbiano 2 repliche R1 e R2 conservare per ciascuna ibridazione solo le colonne come indicato nella normalizzazione. Procedere in parallelo sullo stesso foglio di xls con le normalizzazioni.

Ordinare dati con riga di intestazione Flags R1 crescente

Eliminare tutti gli spot con valore neg (-50 e -100). A questo punto si può verificare il caso che vengano eliminati spot che nella replica R2 erano presenti. Vanno comunque eliminati

Ordinare dati con riga di intestazione Flags R2 crescente. Eliminare tutti gli spot con valore negativo (-50 e -100). A questo punto si può verificare ancora lo stesso avvenuto per la replica R1 ovvero verranno eliminati spot che nella replica R1 erano presenti. Vanno comunque eliminati

Calcolare la deviazione standard per ciascun spot: =inserisci funzione, DevSt (C1:D1)

Calcolare l'errore standard per ciascun spot

Calcolare la media dei due valori di Fold change

Creare una colonna in cui al valore di Fold Change viene sottratto l'errore Standard (positivo) ai valori >2. Vengono eliminati tutti quei geni con valore < 2.

Creare una colonna in cui al valore di Fold Change viene aggiunto l'errore Standard (positivo) ai valori <2. Vengono eliminati tutti quei geni con valore > 2.

Rimarranno quindi solo quei geni significativamente espressi (>2 o <2) nelle due repliche.

### **Estrazione proteica da lievito, test di attività rilassante di Top1 in vitro, immunoprecipitazione e Western blotting**

- Estrazione proteica

Inoculare una singola colonia di lievito in 2 mL di terreno

Incubare 8h 30°C 170rpm

Portare la coltura a 10 mL di terreno

Incubare 16 h 30°C 170 rpm

Portare la coltura a 50 mL di terreno

Incubare 16 h 30°C 170 rpm

Centrifugare i 50 mL di coltura 5' 4°C 1200 g

Eliminare il supernatante

Risospingere in 1 mL di H<sub>2</sub>O

Centrifugare 8' 4°C 1800 g

Eliminare il supernatante

Pesare il pellet

Risospingere in TEEG 1X + Inibitori delle proteasi (1mL/ 1g) (Sigma)

Aggiungere ugual volume di glass bits (Sigma)

Agitare vigorosamente 30'' e incubare in ghiaccio 30'' per 15 volte

Centrifugare 30' 4°C 1800 g

Recuperare il supernatante

Conservare a -80°C

TEEG + Inibitori (1mL):

TEEG 2X 0.5 mL

DTT (1M) 1 uL

PMSF (100mM) 10 uL

Sodio Bisolfito (100mM) 1 uL

Benzamidina (100mM) 10 uL

Pepstatina (1mg/mL) 1 uL

Leupeptina (1ug/mL) 1.25 uL

H<sub>2</sub>O 475.75 uL

TEEG 2X (50mL):

Tris HCl pH8.0 1M 5mL

EDTA (Sigma) 0.5 M 200 uL

EGTA (Sigma) 100mM 1mL

Glicerolo (Sigma) 10% 5mL

H<sub>2</sub>O a volume 38.8 mL

- Quantificazione dell'estratto proteico con Protein Assay Kit Sigma

Preparare i campioni con 500 uL di H<sub>2</sub>O e 2 ul di estratto proteico (nel bianco solo H<sub>2</sub>O)

Aggiungere ad ognuno 500 uL di Lowry Reagent Solution

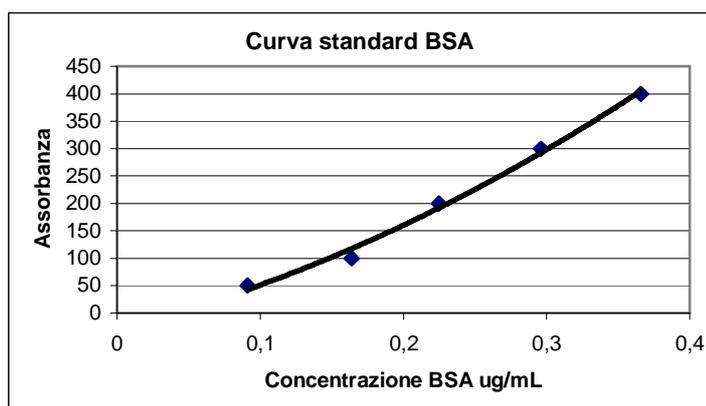
Incubare 20' RT

Aggiungere e mescolare 250 uL di Folin & Clocalten's Phenol Reagent Working Solution

Incubare 30' RT al buio

Leggere la densità ottica a 600 nm da cui si ricava la concentrazione delle proteine per interpolazione dell'assorbanza con la curva standard fatta a concentrazioni note di BSA (fig.14)

Diluire gli estratti in modo da riportarli tutti alla stessa concentrazione



**Figura 27: Curva standard di concentrazioni note della BSA in funzione della loro rispettiva assorbanza a 260 nm. Su questa curva si interpolano i valori di assorbanza deir campioni a concentrazione proteica ignota.**

- Test di attività per la topoisomerasi I di lievito

Reagenti	Concentrazione finale
Buffer 2X	1X
Plasmide pTC1	250 ng
Estratto proteico*	9 uL
H <sub>2</sub> O	A volume (20 uL )

\* diluizioni dell'estratto proteico: 1:1, 1:2, 1:4, 1:8; nel controllo negativo l'estratto è sostituito con H<sub>2</sub>O

Incubare 30' 30°C

Bloccare la reazione con SDS (BioRad) 0.1% e Proteinasi K (Invitrogen) 500ug/mL finali

Incubare 1 h 50°C

Buffer 2X

Tris HCl 50mM pH7.5

MgCl (Sigma) 10mM

NaCl (Sigma) 300mM

DTT (Sigma) 0.2mM

- Immunoprecipitazione della proteina

Equilibrare la concentrazione delle proteine da immunoprecipitare fra i vari campioni in 1 mL di buffer di immunoprecipitazione NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tris-Cl pH 8.0, NP40 1% più inibitori (15-20 mg di estratto proteico totale)

Aggiungere 10 µg di anticorpo specifico (anti-HA e anti-Myc tag) per reazione

Incubare 16 ore a 4°C a 20rpm

Aggiungere 50 µl di beads equilibrate in buffer di immunoprecipitazione

Incubare 3h a 4°C a 20rpm

Centrifugare 1000g 2'

Recuperare il supernatante per controllo

Lavare il pellet in buffer di immunoprecipitazione più inibitori

Risospendere il pellet in ugual volume di buffer Laemli 4X

Incubare 100°C 4'

Centrifugare a massima velocità

Recuperare il supernatante

- Equilibrare sepharose beads (Amersham) in buffer di immunoprecipitazione

Prelevare 1ml della sospensione di sepharose beads (miscela di IgG e IgA, si conserva a 4°C al 20% di MetOH)

Centrifugare 1000g 3'

Eliminare il surnatante

Lavare con acqua

Lavare in buffer di immunoprecipitazione per 2-3 volte

Risospendere il pellet in 500 µl di buffer di immunoprecipitazione e Na-azide 0,05%

Conservare a 4°C

- Western blot

Bollire i campioni di estratto proteico in buffer Laemli 1X per 5 minuti

Caricare in gel di poliacrilammide 6.5% e applicare un campo elettrico appropriato alla dimensione del gel

Effettuare il trasferimento su membrana PVDF (Amersham) in tampone Tris-Glicina-Metanolo 20% O/N a 4°C 140mA (la membrana è pretrattata in 100% v/v di metanolo per 10 minuti, lavata per 5 minuti in acqua ed equilibrata per 10 minuti in buffer di trasferimento; il gel è equilibrato 10 minuti in buffer di trasferimento)

colorare la membrana con rosso poceau per verificare la presenza delle proteine

colorare il gel in comassie brilliant blu per verificare che tutte le proteine si siano trasferite correttamente

Decolorare la membrana in acqua e lavarla in TBS-tween 0.1% pH=7.6

Bloccare la membrana in 10% latte in polvere in TBS-tween 0.1% per 1 h a temperatura ambiente in leggera agitazione

Lavare la membrana due volte per 10 minuti in TBS-tween 0.1%

Incubare la membrana con l'anticorpo primario (con diluizione 1:400 per anti HA 3h, dil 1:1000 anti Myc tag 2h) a temperatura ambiente in agitazione

Lavare la membrana tre volte per 10 minuti in TBS-tween 0.1%

Incubare la membrana con l'anticorpo secondario (con diluizione 1:2000 per anti-mouse 1 h) a temperatura ambiente in agitazione

Incubare con la soluzione kit ECL plus (Amersham)

Acquisire la chemiluminescenza con lo scanner ottico Storm 840 (Amersham Bioscience)

## Southern Blotting

Analizzare su gel di agarosio il DNA genomico digerito con un enzima di restrizione opportuno  
Procedere con il trasferimento su membrana (Hybond-Amersham) con la pompa VacuGene XL (Amersham) posizionando sul VacuGene XL un foglio di carta watman grande quanto la vaschetta  
Dopo averlo bagnato con acqua, poggiare la membrana e sovrapporre il pannello di plastica con il buco in corrispondenza della membrana  
Poggiare il gel sulla membrana  
Sigillare il buco con agarosio low melting  
Accenderla pompa vujoto a 55 mbar  
Coprire il gel con la soluzione di depurinazione (0.2N HCl) e lasciare finchè il blu di bromofenolo non sia diventato giallo  
Spegner la pompa e rimuovere il buffer  
Aggiungere la soluzione di denaturazione (0.5 M NaOH, 0.5 M NaCl), accendere la pompa e attendere che il blu di bromofenolo ritorni al colore blu  
Spegner la pompa e rimuovere il buffer  
Aggiungere la soluzione di neutralizzazione e accendere la pompa per un tempo analogo a quello degli stadi precedenti  
Spegner la pompa e rimuovere il buffer  
Coprire il gel con SSC20X ed incubare per 2 h  
Spegner la pompa, marcare i pozzetti con un ago in modo da perforare leggermente la membrana e avere un punto di riferimento  
Controllare che sul gel non sia rimasto del DNA colorandolo con etidio bromuro  
Lavare la membrana in SSC 20X per 10 minuti  
Porre la membrana fra due fogli di carta watman O/N  
Bagnare la membrana con SSC 2X e porla nei tubi da ibridazione.  
Porre i tubi con la membrana in SSC 2X in rotazione a 42°C  
Rimuovere il buffer SSC 2X e aggiungere la soluzione di ibridazione (SSC 6X, Denhard's reagent 5X, SDS 0.5%, tRNA di lievito 100 µg/ml, formammide 50%, filtrare prima dell'uso)  
Lasciare 1-2 ore in rotazione a 42°C  
Eseguire la marcatura della sonda (kit Amersham):  
    riscaldare 2-3 minuti a 100°C  
    porre in ghiaccio  
    aggiungere a 25-50 ng di DNA [ $\alpha$ -32P]dCTP 50 µCi  
    acqua fino a 50 µl  
    incubare 5-15 minuti a 37°C  
    aggiungere EDTA 0.2 M per fermare la reazione  
    rimuovere i nucleotidi marcati non incorporati con colonnine del kit Amersham  
    centrifugare le colonnine 2 minuti a 735 g  
Denaturare la sonda a 100°C con tRNA di lievito  
Aggiungere alla soluzione di ibridazione già presente nel tubo  
Lasciare in rotazione a 42°C O/N  
Eliminare la soluzione di ibridazione  
Lavare 10 minuti con SSC 2X  
Ripetere il lavaggio precedente  
Lavare con SSC 2X, SDS 0.1% a 65°C due volte per 10 minuti  
Lavare con SSC 1X, SDS 0.1% a 65°C per 15 minuti  
Mettere la membrana nella cassetta di rivelazione, incubare un'ora  
Acquisire la fosforescenza con lo scanner ottico Storm 840 (Amersham Bioscience)

### **Analisi della cinetica di crescita e della variazione di concentrazione di glucosio nel mezzo di crescita della coltura di lievito**

- Allestimento di una curva di crescita

Inoculare una singola colonia di lievito in terreno di crescita

Incubare a 30°C a 170rpm

Leggere la densità ottica OD600 e riportare la coltura a 0,05 in 10ml

Leggere la densità ottica OD600 e contare le cellule in camera di Burkner ad intervalli regolari

- Valutazione della concentrazione di glucosio nel terreno di crescita di lieviti

Inoculare una singola colonia in 5 ml di terreno opportuno

Crescere O/N a 30°C 170 rpm

Leggere la densità ottica a 260 nm e riportarla al valore di 0.05 in beute da 240 ml di terreno opportuno e con concentrazione di glucosio desiderata

Crescere a 30°C 170 rpm

Prelevare 10 ml di coltura prima di inoculare i lieviti (tempo t=0) e a intervalli di 2 h

Centrifugare i 10 ml a 1000 g 5 min a temperatura ambiente

Recuperare surnatante

Scaldare 15 minuti a 80°C

Aggiustare il pH=8.00 con NaOH

Lasciare 15 minuti a temperatura ambiente

Aggiungere 500 µl di solution 1 (D-glucose UV-method Roche) ad una diluizione del campione opportuna (da 1:10 a 1:100); preparare un bianco di controllo aggiungendo dell'acqua al posto del campione da testare- entrambi i campioni vanno portati ad un volume finale di 1 ml con acqua

Incubare 3 minuti a temperatura ambiente

Leggere l'assorbanza ad una lunghezza d'onda di 340 nm

Aggiungere 10 µl della suspension 2 (D-glucose UV-method Roche)

Incubare 15 minuti a temperatura ambiente

Leggere l'assorbanza ad una lunghezza d'onda di 340 nm

Calcolare la concentrazione di glucosio come segue:

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{campione}} - (A_2 - A_1)_{\text{bianco}}$$

$$C = (V * PM / \epsilon * d * v * 1000) * \Delta A$$

V = volume finale (ml)

v = volume del campione (ml)

PM = peso molecolare del glucosio (180.16 g/mol)

d = cammino ottico della luce (cm)

$\epsilon$  = coefficiente di estinzione molare del NADPH ( a 340 nm è 6.3 l x mmol<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>)

- Test di crescita su terreni contenenti diverse concentrazioni di glucosio

Inoculare una colonia in 5 ml di terreno opportuno e far crescere a 170 rpm O/N 30°C

Riportare la densità ottica a 260 nm a 0.3

Effettuare diluizioni seriali (1:10; 1:100; 1:1000; 1:10000; 1:100000)

Depositare volumi di 5 µl sulle piastre opportune con concentrazioni di glucosio finali del 2%, 1%, 0.5%, 0.1%

Far crescere per 3 giorni a 30°C

## Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

- Coltura cellulare e formazione dei crosslinks con formaldeide

Avviare una coltura del ceppo di lievito a densità ottica OD600 0,05 in 240 ml di terreno selettivo  
Incubare a 30°C a 170 rpm per 10-14 h

Leggere la densità ottica OD600 e calcolare le unità OD600 secondo la formula

$$A_{600} * \text{Volume coltura} = \text{Unità OD600}$$

Aggiungere formaldeide alla concentrazione finale di 1%

Agitare bene ruotando la beuta 4-5 volte

Lasciare andare la reazione per 15' (agitare la beuta ogni tanto)

Fermare la reazione aggiungendo glicina 1M alla concentrazione finale di 0.125 M

Incubare per 5'

Trasferire la coltura in falcon da 50 ml e centrifugare a 1000g per 5' 4°C

Lavare con 20 ml di TBS freddo

Risospendere il pellet e centrifugare nuovamente

Risospendere il pellet in TBS freddo in modo da avere 100 Unità OD600 / mL

Aliquotare 100 Unità OD600 per tubo

Centrifugare alla massima velocità ed eliminare surnatante

Il pellet cellulare può essere conservato a -80°C

- Lisi cellulare e preparazione della cromatina

Risospendere il pellet (100 U OD600) in 10 ml di Buffer Z

Aggiungere 3 mg di liticasi (10 mg/ml, 1 mg/5\*10<sup>8</sup> cellule)

Incubare 30 min a 30°C in leggera agitazione

Controllare al microscopio l'avvenuta lisi cellulare

Centrifugare a 3000 g 10' 4°C

Risospendere il pellet in 5 ml di NP-S Buffer + inibitori delle proteasi

Incubare 5' in ghiaccio

Centrifugare 10' a 3000g, 4°C

Risospendere il pellet in 5 ml di NP-S Buffer + inibitori delle proteasi

Centrifugare 10' a 3000g, 4°C

Risospendere in 2 ml di YLB con SDS 0.1% + inibitori delle proteasi

- Sonicazione

Sonicazione con il sonicatore Bramson, potenza high, 15'

30'' ON

50'' OFF

Centrifugare 10000 g 10' 10°C

Recuperare il surnatante

Effettuare un secondo ciclo di sonicazione uguale al primo

- Equilibrare i campioni in base alla lettura di OD260 della cromatina

Aggiungere 10 µl della sospensione della cromatina a 490 µl di SDS 0.5% per misurare l'assorbanza a 260 nm

Conservare il resto della cromatina in ghiaccio

Pipettare per favorire la risospensione (evitare la formazione di schiuma)

Incubare 10' a temperatura ambiente (l'SDS faciliterà la solubilizzazione della cromatina crosslinkata e permetterà al lettura dell'assorbanza)

Procedere alla lettura allo spettrofotometro dopo aver azzerato lo strumento con il bianco

Diluire la cromatina crosslinkata con YLB in modo da avere uguali A260 fra i diversi campioni in un volume di 400 µL

- Controllo della dimensione media dei frammenti ottenuti tramite sonicazione

Prelevare 50  $\mu$ L di cromatina sonicata

Aggiungere 450  $\mu$ L di YEB

Incubare on a 65°C per la reversione dei crosslinks

Incubare a 50°C 4h con Proteasi K 1 mg/ml

Purificare il DNA con una o più estrazioni fenolo/cloroformio

Precipitare il DNA con EtOH e sali

Risospendere il pellet in 20  $\mu$ L di acqua

Incubare con RNase A 1 mg/ml 1h a 37°C

Correre il DNA su gel di agarosio (1,2%) per controllare la dimensione media dei frammenti ottenuti dopo la sonicazione

In figura 28, è riportata la corsa elettroforetica della frammentazione della cromatina in un esperimento rappresentativo. I frammenti hanno una dimensione da 200 a 500 bp.

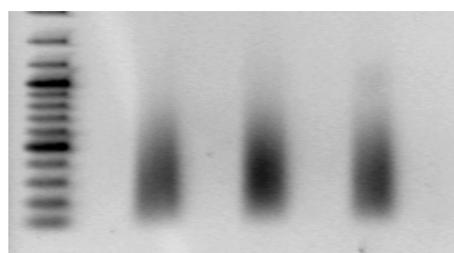


Figura 28. Corsa elettroforetica del DNA frammentato dopo la sonicazione, la digestione delle proteine e dell'RNA in un esperimento rappresentativo.

- Purificazione della cromatina di lievito sonicata ed immunopreclearing

Portare i campioni a 800  $\mu$ L in buffer lisi 1X senza SDS e con inibitori e risospendere (la concentrazione finale di SDS in cui avviene l'immunoprecipitazione è 0,05%)

Caricare 400  $\mu$ L su microcon PCR

Centrifugare 15 minuti 1000g a temperatura ambiente

Ripetere aggiungendo al microcon il volume rimanente

Invertire la resina e recuperare centrifugando 1000g, 2 minuti in un nuovo tubo da 1.5 ml

Bilanciare i campioni in modo da avere per tutti lo stesso volume

Utilizzare 0,3 Unità  $A_{260}$  di cromatina per ogni reazione di immunoprecipitazione secondo la formula

$$A_{260} * \text{Volume cromatina} = \text{Unità } OD_{260}$$

Portare il volume di cromatina per una reazione a 450  $\mu$ l

Generalmente si procede con tre reazioni: una per l'immunoprecipitazione con l'anticorpo specifico,

una per l'immunoprecipitazione con l'anticorpo non immune e un campione non immunoprecipitato,

l'immunopreclearing delle tre reazioni si fa in un unico tubo

Aggiungere 5 $\mu$ g/reazione di anticorpo anti-rabbit o anti mouse

Aggiungere 40  $\mu$ l/reazione di Beads non bloccate

Incubare 1 ora a 4°C in agitazione

- Immunoprecipitazione della cromatina

Centrifugare 1000g 3 minuti a temperatura ambiente

Recuperare il surnatante senza beads

Trasferire in un tubo pulito 450  $\mu$ l del campione per reazione, per il campione input solo 100  $\mu$ l

Aggiungere 5  $\mu$ g di anticorpo in ogni reazione, eccetto che nell'Input

Incubare in agitazione a 4°C on

Gli anticorpi usati sono:

- anti-HA, clone 12CA5 (Roche)
- anti acetyl-Histone H4 (06-866, Upstate)
- anti acetyl Histone H4 Lys16 (06-762, Upstate)
- Histone H4 (ab10158, Abcam)
- anti-Myc Tag, clone 9E10 (05-419, Upstate)
- anti dimethyl-Histone H3 Lys4 (07-030, Upstate)

- Recupero degli immunocomplessi

Aggiungere 30  $\mu$ L di beads bloccate (non nel campione input) e incubare 4 h in agitazione a + 4°C

- Lavaggi della cromatina immunoprecipitata e reversione dei crosslinks

Centrifugare ciascun campione 1000g 3' (non l'Input)

Lavare con 1 mL YLB-140 (X2) 10', centrifugare 1000g 3 min e ripetere lavaggio

Lavare con 1 mL YLB-500 (X2) 10', centrifugare 1000g 3 min e ripetere lavaggio

Lavare con 1 mL YWB (X2) 10', centrifugare 1000g 3 min e ripetere lavaggio

Lavare con 1 mL TE (X2) 10', centrifugare 1000g 3 min e ripetere lavaggio

Risospendere il pellet in 160  $\mu$ L di Buffer Eluizione (YEB)

Portare 100  $\mu$ L di input a 1000  $\mu$ L con Buffer di eluizione (YEB)

Incubare 65°C o/n

- Digestione con proteinasi K e purificazione del DNA

Centrifugare brevemente i campioni per raccogliarli sul fondo del tubo

Aggiungere la proteinasi K a concentrazione finale di 0.5 mg/ml

Incubare 50°C 4h

Centrifugare alla massima velocità i tubi

Trasferire 160  $\mu$ L di soluzione in un tubo pulito senza portarsi dietro le beads (1ml per l'Input)

Purificare il DNA con due estrazioni fenolo/cloroformio

Precipitare il DNA con EtOH 100, sali e glicogeno 10 mg/tubo

Risospendere il pellet in 50  $\mu$ L di TE per i campioni immunoprecipitati, 100  $\mu$ L per l'Input (10%)

Preparare la curva standard nel range opportuno per la quantità di DNA immunoprecipitato

#### Buffer Z

Sorbitolo	1	M
TrisCl, pH 7.4	50	mM
Mercaptoetanolo	10	mM

#### NP-S Buffer

Spermidina	0.5	mM
TrisCl, pH 7.4	10	mM
NP-40	0.075	%
NaCl	50	mM
EDTA	10	mM
Mercaptoetanolo	1	mM

#### TBS pH=7.6 (1L)

Trizma Base	2.42	g
NaCl	8	g

**Yeast lysis buffer (YLB) 10X**

HEPES, pH 7,5	500	mM
EDTA	10	mM
NaCl	1.4	M
Triton X100	10%	
Sodium deoxycholate	1%	

**ChIP lysis buffer 500mM (YLB-500)**

HEPES, pH 7,5	50	mM
EDTA	1	mM
NaCl	500	mM
Triton X100	1	%
Sodium deoxycholate	0.1	%

**ChIP wash buffer (YWB)**

TrisCl, pH 8,0	10	mM
EDTA	1	mM
LiCl	250	mM
NP-40	0.5%	
Sodium deoxycholate	0.5%	

**ChIP elution buffer**

TrisCl, pH 8,0	50	mM
EDTA	10	mM
SDS	1	%

**TE**

TrisCl, pH 8,0	10	mM
EDTA	1	mM

• **Preparazione delle Protein A/Protein G Sephatose beads**

		NON-BLOCKED BEADS	BLOCKED BEADS
		Volume, $\mu$ l	V, $\mu$ l
pA beads	(sospensione al 50%)	750	750
pG beads	(sospensione al 50%)	750	750
<b>Lavare 4-5 volte con acqua (1000g, 3min 4°C) Alle beads asciutte aggiungere</b>			
H <sub>2</sub> O		600	600
YLB 10x		150	150
<b>Equilibrare per 10 min in agitazione, centrifugare 1000g, 3 min, 4°C, aspirare il surnatante e aggiungere:</b>			
H <sub>2</sub> O		660	571
YLB 10x		75	75
BSA (DNAase free)	9,95 mg/ml	-	50
s.s. DNA	10,5 mg/ml	-	6
tRNA	10 mg/ml	-	33
azide 5%	5%	15	15

## ChIP per proteine TAP-tagged

Il ceppo YOL006C-TAP (Ghaemmaghami et al., Nature, 425, 737-741, 2003) porta l'ORF YOL006C fusa con un epitopo ad alta affinità espresso dalla sua naturale posizione cromosomica. BY4741 è il ceppo di controllo.

Far crescere la coltura di lievito in 400 ml di terreno fino ad OD ~0.5  
Fissare le cellule con formaldeide 1% (11.4 ml di formaldeide 36%) per 20 minuti a temperatura ambiente, agitando occasionalmente  
Aggiungere glicina ad concentrazione finale di 240 mM (7.40 gr) e incubare 5'  
Raccogliere le cellule e lavare 2 volte con TBS freddo (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl)  
Lavare 1 volta con FA-lysis buffer freddo  
Risospendere in 1 ml di FA-lysis buffer freddo contenente 0.5% SDS  
Rompere le cellule aggiungendo un ugual volume di "glass beads" (diam. 0.5 mm) e vortexando per 15' in ghiaccio  
Diluire il lisato in 8 ml di FA-lysis buffer; bucare il fondo del tubo e raccogliere il lisato con una breve centrifugazione  
Pelletare la cromatina "crosslinkata" centrifugando a 20000 g 20'  
Lavare la cromatina per 1 ora con FA-lysis buffer e risospendere in 1.5 ml di FA-lysis buffer per 1 h a 4°C  
Sonicare in modo da avere frammenti di 200-700 bp  
Portare il volume dei campioni a 8 ml con FA-lysis buffer, chiarificare centrifugando a 20000 g 20'  
Conservare le aliquote di cromatina (800 µL) a -80°C  
Per precipitare le proteine TAP-tagged, lavare 2 volte "rabbit IgG-agarose" con TE  
Mescolare 10 µL di "beads" con 800 µL di cromatina e incubare o/n a 4°C  
Non immunoprecipitare un campione (controllo "input" da usare in PCR)  
Lavare le "beads" con  
    1.4 ml di FA-lysis buffer + 275 mM NaCl,  
    1.4 ml di FA-lysis buffer + 500 mM NaCl,  
    1.4 ml di wash buffer (cfr. YWB)  
    1.4 ml di TE  
Eluire dalle "beads" la cromatina immunoprecipitata scaldando per 10 minuti a 65°C in 200 µL di 50 mM Tris, pH 7.5, 10 mM EDTA, 1% SDS  
Recuperare il surnatante (centrifugare brevemente, se necessario)  
Lavare le "beads" con 200 µL di TE  
Aggiungere il TE al surnatante  
Lavare la cromatina in condizioni stringenti – passaggio opzionale  
Aggiungere Pronase 0.8 mg/ml e incubare per 1 ora a 42°C e per 5 ore a 65°C  
Estrarre il DNA con fenolo-cloroformio-isoamyl alcool e cloroformio  
Precipitare il DNA con etanolo 100% e sodio acetato 3 M, a -20°C o/n, con 20 µL di glicogeno  
Risospendere in TE buffer

FA-lysis buffer  
50 mM HEPES-KOH pH 7.5  
150 mM NaCl  
1 mM EDTA  
1% Triton X-100  
0.1% sodio deossicolato  
0.1% SDS  
1 mM PMSF

---

**Formazione dei complessi Top1-telomero *in vivo* con precipitazione con K<sup>+</sup>-SDS**

Far crescere la coltura di lievito a 30°C 170 rpm on  
Preparare i protoplasti digerendo la parete in Buffer Z con lyticasi 10mg/ml  
Trattare con CPT in buffer di cleavage 3' RT  
Trattare i campioni con SDS 1%  
Sonicare con tre cicli a potenza del 10% e tre con potenza del 15%  
Aggiungere 0,1 Vol di KCl 2.5 M  
Incubare 15' in ghiaccio  
Centrifugare i precipitati a 12000 g 3'  
Lavare i pellet tre volte con 0,1 Vol di KCl 2.5 M e ytRNA 1µg/ml  
Incubare i pellet con proteinasi K 50 µg/ml a 56°C 30'  
Purificare il DNA con estrazione con fenolo/clorormio/alcool isoammilico  
Precipitare con sali  
Analizzarlo con RT-PCR

**Buffer di cleavage:**

3 mM CaCl<sub>2</sub>  
1 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM Tris-Cl pH 8.0  
1 M sorbitolo

## Capitolo 3

# RISULTATI

---

### **3.1. Costruzione di plasmidi per l'espressione di DNA Topoisomerasi I in lievito**

Nella nostra attività di ricerca abbiamo scelto le cellule eucariotiche del lievito *S. cerevisiae* come modello di studio allo scopo di indagare gli effetti cellulari della DNA Topoisomerasi IB e della sua attività enzimatica sull'espressione genica. Questo lievito è un microrganismo comunemente utilizzato durante la preparazione della birra e del pane e costituisce un ottimo modello per la facilità di manipolazioni genetiche e la sua efficiente crescita nelle condizioni di laboratorio.

E' stato scelto un ceppo di lievito in cui il gene TOP1, che codifica per la DNA Topoisomerasi IB, è stato inattivato a livello cromosomico ma ripristinato a livello plasmidico, cioè mediante l'uso di un plasmide (pCC10, gentilmente donato dal prof. G. Camilloni, Università La Sapienza di Roma) (42) che esprime il gene wild type TOP1 di lievito sotto il controllo del suo stesso promotore. I plasmidi usati sono a basso numero di copie (2-3 per cellula) in modo da avere livelli di espressione della proteina il più possibile simili a quelli fisiologici. Sono stati preparati, inoltre, ulteriori costrutti che esprimono l'enzima inattivo (pAR7) ed entrambi gli enzimi (quello cataliticamente attivo ed inattivo, rispettivamente in pCC10-HA e pAR7-HA) fusi in N-terminale ad un peptide riconosciuto specificamente da un anticorpo allo scopo di immunoprecipitare le proteine per verificarne i livelli di espressione e per i successivi studi di localizzazione sulla cromatina.

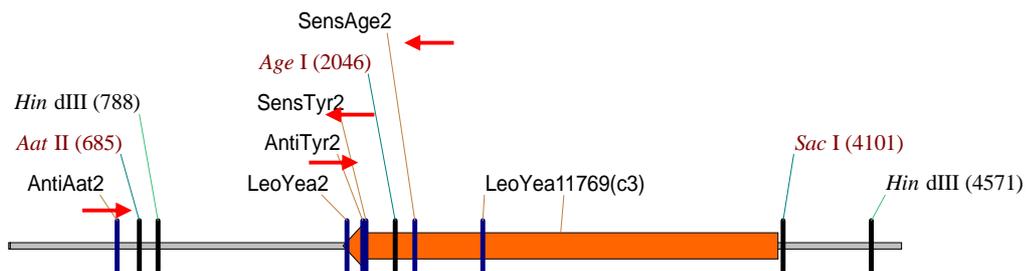
I plasmidi che sono stati preparati durante il lavoro di tesi sono riportati di seguito insieme alle loro caratteristiche.

#### **3.1.1 Costruzione del plasmide pAR7**

Allo scopo di ottenere la DNA Topoisomerasi I inattiva è stato modificato, con una mutazione puntiforme, il residuo della Tyr catalitica in posizione 727 in Phe. Tale mutazione è stata inserita tramite PCR usando come stampo il gene per Top1 wild type di lievito che è contenuto nel plasmide pCC10 (figura 23 in materiali e metodi).

Il plasmide pCC10 deriva a sua volta dal plasmide YCp50 (figura 22 in materiali e metodi) e si distingue da esso per la presenza del gene per Top1 di lievito posto sotto il controllo del suo promotore endogeno. YCp50, e di conseguenza tutti i suoi derivati, ha una sequenza CEN-ARS che controlla la replicazione (ARS: origine di replicazione autonoma) e la segregazione plasmidica alla mitosi (CEN: sequenza centromerica); il plasmide è presente, pertanto, all'interno della cellula di lievito in numero di copie di circa 2-3. Esso porta, inoltre, come marcatori di selezione i geni URA3 (orotidine-5'-phosphate decarbossilasi), TCr (tetraciclina resistenza) e APr (ampicillina resistenza).

Il plasmide pCC10 è stato utilizzato come stampo nelle reazioni di PCR con i seguenti primers: SensTyr2, AntiTyr2, AntiAat2 e SensAge2 (figura 29). Di questi, AntiAat2 si appaia vicino al sito di restrizione per AatII presente nel plasmide ed esterno alla sequenza codificante della Topoisomerasi I; SensAge2 nei pressi del sito di restrizione per AgeI, nella sequenza codificante per l'enzima (i due siti di restrizione AatII e AgeI sono presenti nel frammento amplificato con questi primers); SensTyr2 e AntiTyr2 si appaiano entrambi su 36 basi fra le quali è compresa la tripletta codificante per la tirosina catalitica 5'-TAT-3' (figura 30). Questo codone è mutato nella seconda base nei due primers diventando 5'-TTT-3' codificante per la fenilalanina (Phe), che differisce dalla Tyr per il solo gruppo OH dell'anello aromatico della catena laterale. Le reazioni di PCR sono state eseguite con la DyNAzyme II DNA polymerase e utilizzando il termociclo MUT. Le due reazioni di PCR con le coppie di primers AntiAat2-SensTyr2 e SensAge2-AntiTyr2 hanno prodotto due frammenti di DNA del peso molecolare atteso di 310 bp e 1352 bp (Figura 31). I due frammenti, isolati con gel elettroforesi, estratti da gel d'agarosio e purificati, sono stati assemblati per ottenere un frammento unico tramite l'appaiamento di 50 paia di basi delle due regioni terminali, con una reazione di PCR senza primers. La reazione di PCR senza primers è stata eseguita con la PLATINUM™*pfx*DNA polymerase, usando i due frammenti di DNA in un rapporto molare di 4:2 (310 bp:1352 bp) ed il termociclo MUT. Il frammento finale di 1612 bp è stato amplificato con un'ulteriore PCR usando i primers esterni, SensAge2 e AntiAat2 (figura 32).



**Figura 29.** Posizione dei primers utilizzati lungo la sequenza codificante di TOP1 di lievito in pCC10. La CDS della Top1 di lievito e la direzione di trascrizione sono indicate dalla freccia arancione. Sono mostrati alcuni siti di restrizione ed i primer AntiAat2, SensTyr2, AntiTyr2 e SensAge2 (la freccia rossa indica direzione 5'→3').

Sequenza Wild Type:

```

cgtatccaaactagttccattcagttgaaagataaagaggaaaactcccaggtttcactg
gcataggtttgatcaaggtaagtcaactttctatattctccttttgagggtccaaagtgac
R I Q T S S I Q L K D K E E N S Q V S L
ggcacttccaaaatcaatTATatagaccctagactttctgtggtatTTTgcaaaaagtat
ccgtgaaaggttttagttaataTATatctgggatctgaaagacaccataaaaacgTTTTcata
G T S K I N Y I D P R L S V V F C K K Y
gatgttccgattgaaaagatttttacaaaaaccctaagagaaaaattcaaatgggccata
ctacaaggctaacttttctaaaaatgTTTTgggattctctTTTtaagttaccgggtat
D V P I E K I F T K T L R E K F K W A I

```

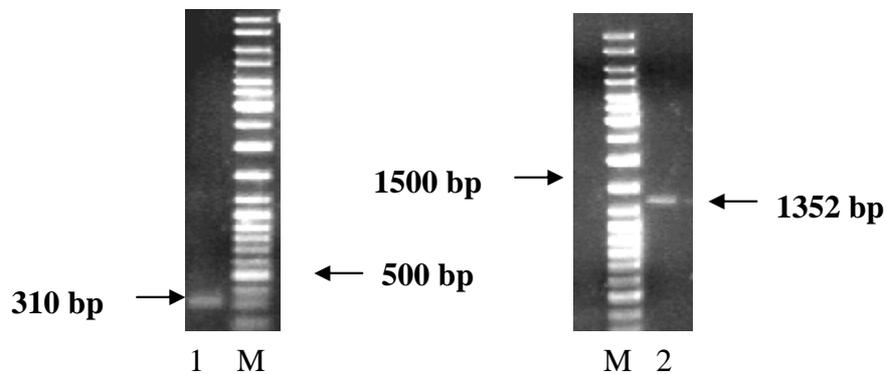
Sequenza Mutante (primer SensTYR2, primer AntiTYR2):

```

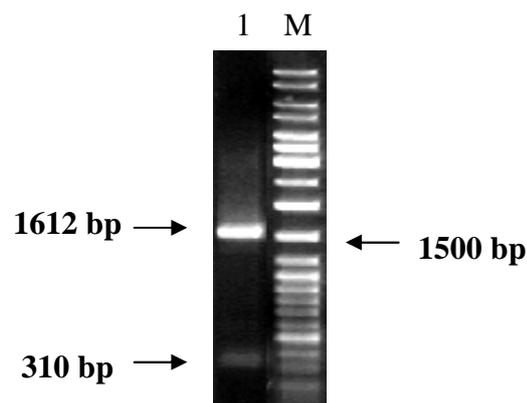
cgtatccaaactagttccattcagttgaaagataaagaggaaaactcccaggtttcactg
gcataggtttgatcaaggtaagtcaactttctatattctccttttgagggtccaaagtgac
R I Q T S S I Q L K D K E E N S Q V S L
ggcacttccaaaatcaatTTTatagaccctagactttctgtggtatTTTgcaaaaagtat
ccgtgaaaggTTTTagttAAAatctctgggatctgaaagacaccataaaaacgTTTTcata
G T S K I N F I D P R L S V V F C K K Y
gatgttccgattgaaaagatttttacaaaaaccctaagagaaaaattcaaatgggccata
ctacaaggctaacttttctaaaaatgTTTTgggattctctTTTtaagttaccgggtat
D V P I E K I F T K T L R E K F K W A I

```

**Figura 30.** Sequenze nucleotidiche della Topoisomerasi I wild type e mutata di lievito. La sequenza mostrata si estende da 1041bp a 1221bp del plasmide pCC10. Nel wild-type la tripletta TAT per la tirosina catalitica è evidenziata in violetto, nel mutante la tripletta mutata TTT codificante per la fenilalanina è evidenziata in verde. I primers con la mutazione sono SensTyr2 in giallo e AntiTyr2 in azzurro.



**Figura 31: PCR mutageniche. pozzetto 1: corsa elettroforetica del prodotto da 310 bp della PCR con i primers SensAge2-AntiTyr2; pozzetto 2: corsa elettroforetica del prodotto da 1352 bp della PCR con i primer AntiAat2-SensTyr2.**



**Figura 32. PCR con i primers AntiAat2-SensAge2. Pozzetto 1: corsa elettroforetica del prodotto di PCR di 1612 bp. A 310 bp si vede anche il frammento d'origine che nella PCR self-priming è in eccesso.**

Il frammento di PCR da 1612 bp ottenuto, contenente il codone 727 mutato da TAT in TTT, è stato clonato nel vettore pCR2.1-TOPO con il TopoTA Cloning System (fig. 24 in materiali e metodi), poi inserito tramite elettroporazione nel ceppo di *E. coli* Top10-F'. Sono state ottenute 103 colonie resistenti al marcatore ampicillina, solo 9 colonie nel controllo negativo. Su 18 colonie di 103 è stato eseguito un primo screening con PCR Colony (eseguita con Taq DNA polymerase Promega e termociclo MUT) per verificare l'effettiva presenza dell'inserito ed il suo orientamento nel vettore. I primers usati e il prodotto atteso, a seconda dell'orientamento dell'inserito sono riassunti nella

tabella 2. Le due modalità di inserimento possibili sono in direzione AgeI – AatII oppure AatII – AgeI (con riferimento ai siti di restrizione) rispetto al primer M13 reverse sul plasmide pCR2.1 TOPO. Delle 18 colonie, 9 sono state analizzate con le coppie di primers forward/SensTYR2 e M13 forward/AntiTYR2. La prima coppia di primer amplifica un prodotto dal peso molecolare di 1463 bp per se l’inserto si è inserito nel verso AgeI – AatII, altrimenti non si verifica amplificazione perché i primers risultano divergenti; la seconda coppia di primer amplifica un prodotto di 421 bp, con se si è inserito in direzione opposta AatII – AgeI. Allo stesso modo, sulle altre 9 colonie analizzate, i primers M13 Revers/SensTYR2 e M13 Reverse/AntiTYR2 daranno rispettivamente un prodotto da 1442 bp (inserimento AgeI – AatII) oppure da 400 bp (inserimento AatII – AgeI).

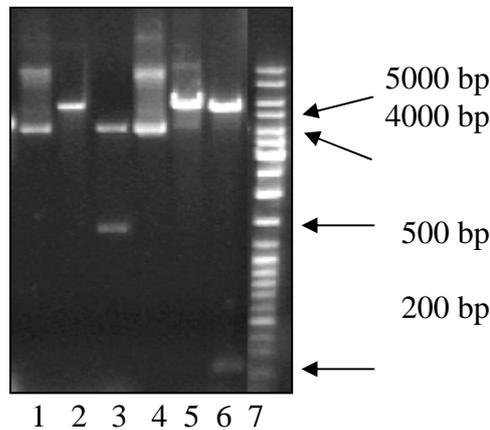
Colonie campione	Primer Forward	Primer Reverse	PM atteso inserimento AgeI – AatII	PM atteso inserimento AatII-AgeI
1-9 A	M13 Forward	SensTYR2	1463bp	-
1-9 B	M13 Forward	AntiTYR2	-	421bp
10-18 A	M13 Reverse	SensTYR2	1442bp	-
10-18 B	M13 Reverse	AntiTYR2	-	400bp

**Tabella 2: Schema dello screening: sono riportati i pesi molecolari (PM) dei prodotti attesi a seconda delle coppie di primer usate. Il segno – indica assenza di amplificazione.**

Delle 18 colonie, 8 risultano positive per il plasmide con l’inserto nella direzione corretta: esse sono state ulteriormente analizzate tramite l’estrazione del DNA plasmidico. 5 plasmidi degli 8 risultano di peso molecolare maggiore, indicando un possibile inserimento del frammento clonato: essi sono stati analizzati tramite analisi di restrizione con l’enzima di restrizione Hind III che taglia una volta sul plasmide pCR2.1-TOPO vuoto ed una volta all’interno dell’inserto, dando frammenti di 277 bp e 5266 bp se l’inserto è inserito nel verso AatII - AgeI, oppure di 1453 bp e 4089 bp se è inserito nel verso opposto AgeI – AatII. Un’ulteriore analisi è stata condotta utilizzando l’enzima Sac I che linearizza il plasmide: il peso molecolare atteso è per il plasmide ricombinante di 5543 bp (3931 bp del vettore vuoto + 1612 bp del frammento mutato). I

risultati mostrano che i 5 plasmidi analizzati sono positivi per l'inserto e che l'inserzione è avvenuta in entrambi gli orientamenti (figura 33). In particolare, nel pozzetto 6 della figura 33, Hind III riconosce sul plasmide estratto dal clone 8 due siti di taglio producendo due frammenti di 5266 bp e 277 bp, che indicano l'inserimento nella direzione AatII-AgeI.

Il plasmide pAR8 è stato sequenziato con i primer M13 forward e M13 reverse (figura 34 e 35). L'allineamento fra il filamento antisenso del plasmide pCC10 wild type e del plasmide sequenziato mostra che la mutazione del codone 727 (da 5'-ATA-3' a 5'-AAA-3') è presente ed è unica. Il clone pAR8 è stato quindi utilizzato nelle fasi successive del lavoro.



**Figura 33. Analisi di restrizione del DNA plasmidico dai cloni 6 (pozzetti 1-3, possibile negativo) e 8 (pozzetti 4-6, possibile positivo). Pozzetti 1 e 3: plasmidi non digeriti; pozzetti 2 e 4: plasmidi linearizzati con Sac I; pozzetti 3 e 6: plasmidi digeriti con Hind III.**

```

pCC10 wt-----TCAAGAGATACGGACAATACGTTTCTTATATGCAGGTAAC TAAGAA
                ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
pAR8      TTGCTTCCAAAACATCAAGAGATACGGACAATACGTTTNTTATATGCAGGTAAC TAAGAA

ATAATAGGAGGGGTAAAGTAACTGTGGCATGATTACACTGCAGTATACTCTTTAAAAGTT
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
ATAATAGGAGGGGTAAAGTAACTGTGGCATGATTACACTGCAGTATACTCTTTAAAAGTT

TTAAATTATTTCTATATATGTGTATAAGATATCTTCCTAGTAACCCTAATGCGAACTTGA
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TTAAATTATTTCTATATATGTGTATAAGATATCTTCCTAGTAACCCTAATGCGAACTTGA

TGCGTGAATGTATTTGCTTCTCCCTATGCTGCGTTTCTTTGCGTTAAAACCTCCAATTT
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TGCGTGAATGTATTTGCTTCTCCCTATGNTGCGTTTCTTTGCGTTAAAACCTCCAATTT
    
```

```

TCATCTACCGATTCTATGGCCCATTTGAATTTTCTCTTAGGGTTTTGTAAAAATCTTT
:
:
TCATCTACCGATTCTATGGCCCATTTGAATTTTCTCTTAGGGTTTTGTAAAAATCTTT

TCAATCGGAACATCATACTTTTTGCAAAATACCACAGAAAGTCTAGGGTCTATATAATTG
:
:
TCAATCGGAACATCATACTTTTTGCAAAATACCACAGAAAGTCTAGGGTCTATAAAATTG

ATTTTGAAGTGCCAGTGAAACCTGGGAGTTTTCTCTTTATCTTTCAACTGAATGGAA
:
:
ATTTTGAAGTGCCAGTGAAACCTGGGAGTTTTCTCTTTATCTTTCAACTGAATGGAA

CTAGTTTGGATACGCTGTTCTAATTTCTCTACTTGTGCTTTTATTTTTTCGACTGAATTC
:
:
CTAGTTTGGATACGCTGTTCTAATTTCTCTACTTGTGCTTTTATTTTTTCGACTGAATTC

CAACTTGATTTAGTTCCACTTCACCGGTTTTCAATTCCTTTTCGAATTCTTGTTCCTTT
:
:
CAACTTGATTTAGTTCCACTTCACCGGTTTTCAATTCCTTTTCGAATTCTTGTTCCTTT

TCGTCGACTTTCTCCAACCATTCCTTCAATTGACTTTCCGGCAATAATTCTTCCTTTTCA
:
:
TCGTCGACTTTCTCCAACCATTCCTTCAATTGACTTTCCGGCAATAATTCTTCCTTTTCA
    
```

**Figura 34. Allineamento dei DNA plasmidici di pCC10 con pAR8 sequenziato con il primer M13. In rosso è evidenziata la mutazione di Tyr 727 in Phe. In azzurro è evidenziato il sito di restrizione di AgeI.**

```

pCC10wt      ATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAA
:
:
pAR8         -----GGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAA

ACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGCTTAAGAAACCAT
:
:
ACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGCTTAAGAAACCAT

TATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGA
:
:
TGTTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGA

ATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAAGCTTGTACTAGCGCTCGTGGTGATTTTG
:
:
ATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAA-GCTTGTACTAGCGCTCGTGGTGATTTTG

GGCATTTTAGTGCTTGAAGTGACATTATGACTTGACGAAACATCCTTACTGGTTAC-TGA
:
:
GGCATTTTAGTGCTTGAAGTGACATTATGACTTGACGAAACATCCTTACTGGTTACCTGA

GCTTTTGCCTAAGGACG-TGGTTGTCTTGGCTGAAGAGCTGCCTTTACTAGAACTATCTG
:
:
GCTTTTGCCTAAGGACGGTGGTTGTCTTGGCTGGAGAGCTGCCTTTACTAGAACTATCTG

CTGCCTTTGTACTACTTGATAAAGAGGGCAAATTTGCAGCGGAGACAAGTTGAAATTCCTT
:
:
CTGCCTTTGTACTACTTGATAAAGAGGGCAAATTTGCAGCGGAGACAAGTTGAAATTCCTT
    
```

**Figura 35. Allineamento dei DNA plasmidici di pCC10 con pAR8 sequenziato utilizzando il primer M13 reverse. In verde è evidenziato il sito di restrizione di AatII. Le mutazioni eventualmente avvenute, a valle del sito per AatII, sono esterne alla CDS di Top1.**

Il frammento che porta la mutazione T→F nel plasmide pAR8 è stato clonato nel pCC10 per ricombinazione omologa in lievito. Il frammento è stato amplificato dal pAR8 con una reazione di PCR con i primers SensAge2-AntiAat2 con la PLATINUM™*pf*xDNA polymerase ed il termociclo MUT, è stato poi purificato con Amicon PCR-Microcon. Il plasmide pCC10 è stato predigerito con gli enzimi AgeI e AatII, successivamente defosforilato con l'enzima CIP in modo da sfavorire la richiusura dei suoi terminali 3' e 5' ed infine purificato tramite eluizione da gel ed utilizzato come vettore per trasformare il lievito.

10ml di coltura di lievito a densità ottica  $A_{600}$  di circa 1.0 sono state trasformate con 50 ng di vettore linearizzato (pCC10) e con l'inserto di pAR8 in un rapporto molare di 1:1000. La selezione dei lieviti ricombinanti è stata eseguita con terreno selettivo URA-, poiché il vettore porta il marcatore di selezione URA3. Sono state ottenute circa 1000 colonie (valore dello stesso ordine di grandezza del controllo positivo), 35 colonie dalla trasformazione con il solo pCC10 linearizzato (controllo negativo). Questo risultato suggerisce che la ricombinazione omologa sia avvenuta efficientemente.

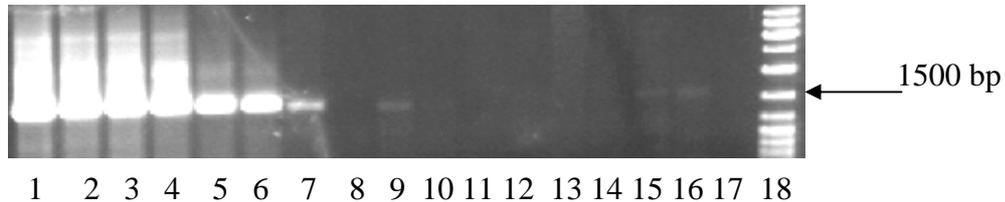
La selezione del clone positivo è stata effettuata attraverso più passaggi:

- le colonie di lievito sono raccolte in un pool da cui si sono estratti i plasmidi.
- il DNA del pool plasmidico è trasferito in *E. coli* Top10-F'. In questo passaggio sono state ottenute  $\leq 500$  colonie per il pCC10 mutante,  $\approx 500$  colonie per il controllo positivo, 0 colonie per il negativo.
- su 16 delle 500 colonie mutanti, è stata eseguita una PCR Colony (figura 36) con i primer (AntiAatII-SensAgeI) esterni ai siti di taglio degli enzimi AgeI e AatII, con Taq DNA polymerase Promega ed termociclo MUT. 10 delle 16 colonie mostrano la presenza dell'inserto di interesse.
- Dalle 10 colonie batteriche positive è estratto il plasmide. 9 di essi mostrano lo stesso peso molecolare di pCC10.
- I 9 plasmidi positivi sono digeriti con Hind III: l'enzima taglia due volte il plasmide, rilasciando due bande da 3783 bp e 7956 bp. I 9 campioni danno tutti lo stesso pattern di digestione del controllo positivo pCC10 (Figura 37).

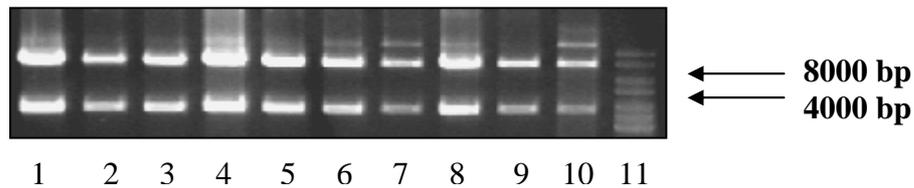
Uno di essi (pAR7) è stato sequenziato con il primer SeqAge2. La sequenza ha mostrato che la regione codificante per la Topoisomerasi I si è ricostituita integralmente

mantenendo il registro di lettura corretto e il codone 727 risulta essere 5'-TTT-3', codificante per la Phe e non più per la Tyr.

Pertanto, il plasmide pAR7 contiene un cDNA codificante per la Topoisomerasi I mutata e inattiva sotto il controllo del promotore endogeno del gene TOP1 di lievito.



**Figura 36.** Corsa elettroforetica dei prodotti di PCR colony su singole colonie di batteri dopo ricombinazione omologa in lievito. Il peso molecolare atteso è di 1361 bp.



**Figura 37.** Corsa elettroforetica dei prodotti di digestione con Hind III dei plasmidi ricombinati (clone 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 15 e 16, pozzetto 1-9), del pCC10 (pozzetto 10).

### 3.1.2 Plasmide pCC10HA

Allo scopo di studiare l'espressione e la localizzazione in siti genomici di cellule di lievito tramite immunoprecipitazione della cromatina della Topoisomerasi I codificata dal plasmide pCC10, abbiamo inserito, all'N-terminale della CDS codificante per enzima, un triplo epitopo di emoagglutinina (3xHA) riconosciuto specificamente dall' anticorpo 12CA5 (Roche). In particolare, abbiamo clonato una sequenza codificante tale epitopo nel sito di restrizione per l'enzima MluI su pCC10 posto a monte del codone di inizio del gene TOP1.

Sono stati fatti sintetizzare due primers HAFw e HARw ed un frammento di 100 bp (epitopo HA) con la sequenza codificante il triplo epitopo di emoagglutinina (Figura 38). HARw porta la sequenza ATG per l'inizio della traduzione dell'epitopo ed è complementare al 3' del DNA stampo dell'epitopo HA, HAFw invece è omologo al 5' del DNA stampo dell'epitopo HA. I due primers sono stati utilizzati per effettuare una PCR (termociclo HA) utilizzando come stampo il frammento epitopo HA (figura 39).

I due primer ripristinano, inoltre, un sito di restrizione per MluI per ciascuna parte del frammento.

```

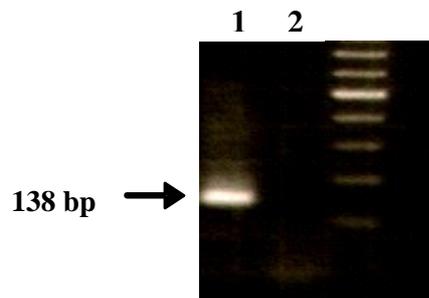
1  ACGCGTCCCA TATGGCACTG AGCAGCGTAA TCTGGAACGT CGTATGGATA
   TCGCGAGGGT ATACCGTGAC TCGTCGCATT AGACCTTGCA GCATACCTAT

51  AGATCCTGCA TAGTCCGGGA CGTCATAGGG ATAGCCCAGCA TAGTCAGGAA
   TCTAGGACGT ATCAGGCCCT GCAGTATCCC TATCGGGCGT ATCAGTCCTT

101 CATCGTATGG GTAAAAGATG CGGCCATT TTTACGCGT
    GTAGCATACC CATTTTCTAC GCCGGTAAA AATGCGCA

```

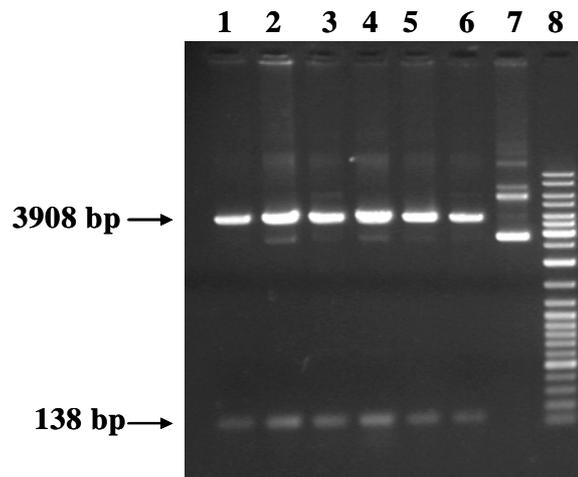
**Figura 38. Sequenza dell'epitopo di emoagglutinina. In rosso HARw, in blu HARw, sottolineato l'epitopoHA.**



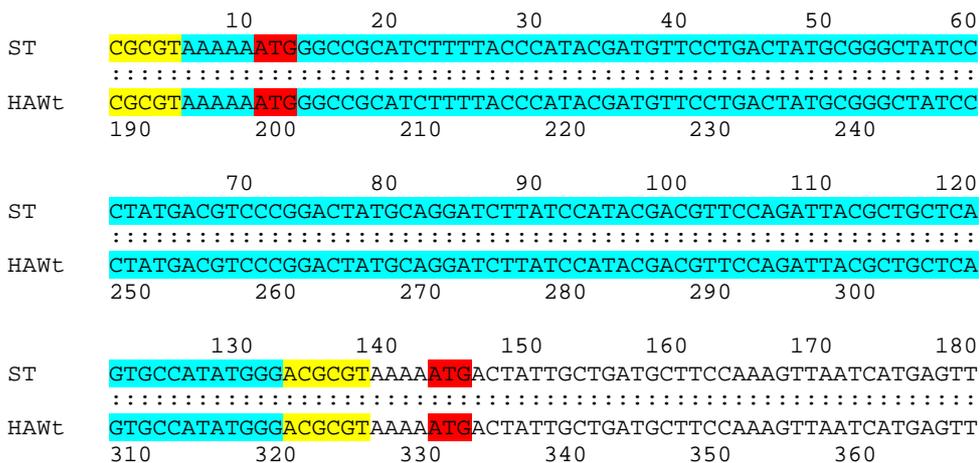
**Figura 39. PCR per l'amplificazione dell'epitopo HA completo. PCR con i primers HAFw e HARw su epitopoHA (pozzetto 1), controllo negativo (pozzetto 2).**

Il frammento di PCR ottenuto è stato clonato nel vettore pCR2.1-TOPO con il TopoTA Cloning System, poi inserito per elettroporazione nel ceppo di *E. coli* Top10-F'. Dalle colonie ottenute sono stati purificati i DNA plasmidici e controllati tramite PCR per verificare la presenza dell'inserto. Risultano essere positivi i cloni 3, 5, 6, 7, 8 e 10. Questi plasmidi sono stati digeriti con l'enzima di restrizione MluI: così è stato verificato che tutti sono positivi per l'inserto (figura 40); questo frammento (138 bp) è stato purificato da gel di agarosio. Si è proceduto ad una reazione di ligasi tra l'inserto e il plasmide pCC10 digerito anch'esso con MluI, defosforilato nelle estremità per sfavorirne la richiusura, in diversi rapporti molarli: 1:1, 2:1, 4:1, 8:1. Con i prodotti di tali reazioni è stato trasformato, tramite elettroporazione, il ceppo di *E. coli* Top10 F'. Da 20 delle colonie ottenute si è estratto il DNA plasmidico. Si è controllato il corretto inserimento dell'inserto tramite reazione di PCR con i primer che si appaiano a monte

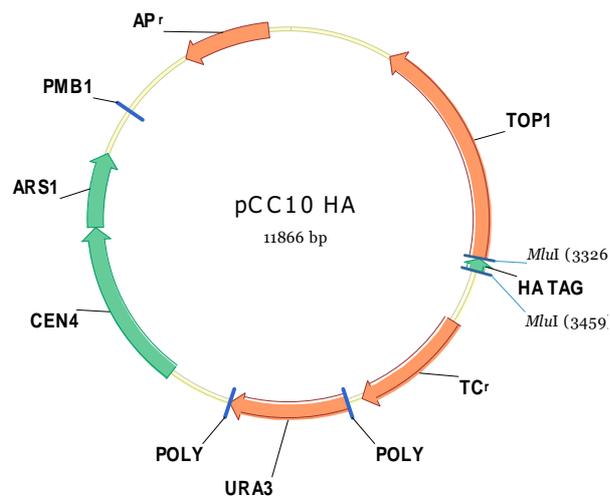
dell'inserto per HA. La prima coppia dà origine ad un frammento di 361 bp la seconda coppia di 365 bp se il frammento si è inserito nell'orientamento corretto. Se l'inserto si inserisce in senso opposto, le coppie di primers utilizzate non sono in grado di dare origine ad un prodotto di amplificazione, perché risultano essere divergenti. Da tale analisi risultano essere positive tre colonie. Da queste colonie è stato estratto il plasmide e controllato tramite sequenziamento (figura 41): l'epitopo si è inserito nel modo corretto. Il plasmide ottenuto è il pCC10HA (figura 42).



**Figura 40.** Corsa elettroforetica dei plasmidi pCR2.1 TOPO-TA con l'inserto HA digeriti con l'enzima MluI. Pozzetti 1-6: clone 3, 5, 6, 7, 8, 10; pozzetto 7: plasmide non digerito.



**Figura 41.** Allineamento della sequenza teorica (ST) di HA-Top1 wt (linea superiore) e della sequenza del plasmide pCC10-HA (HAWt, linea inferiore). In azzurro è evidenziata la sequenza dell'epitopo HA, in giallo i siti di restrizione di MluI, in rosso le ATG dell'epitopo HA da cui parte la traduzione in frame con l'ATG di Top1.

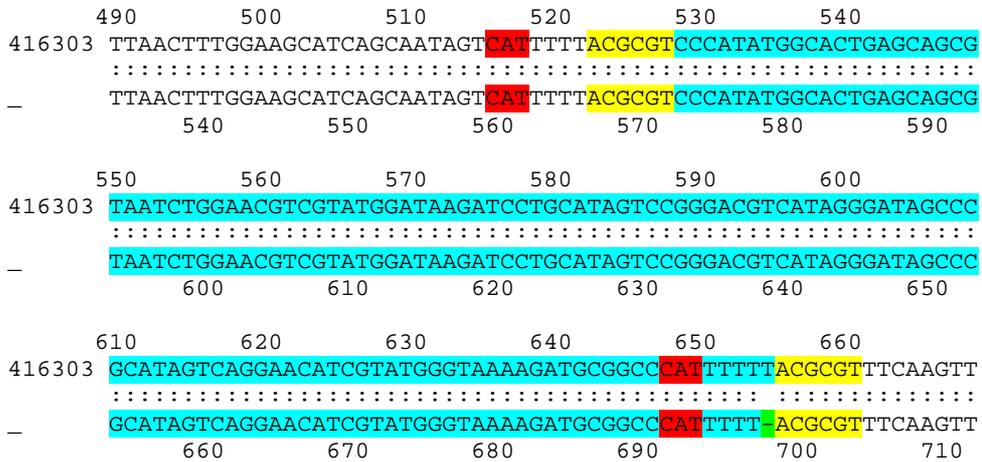


**Figura 42. Mappa del plasmide pCC10HA.**

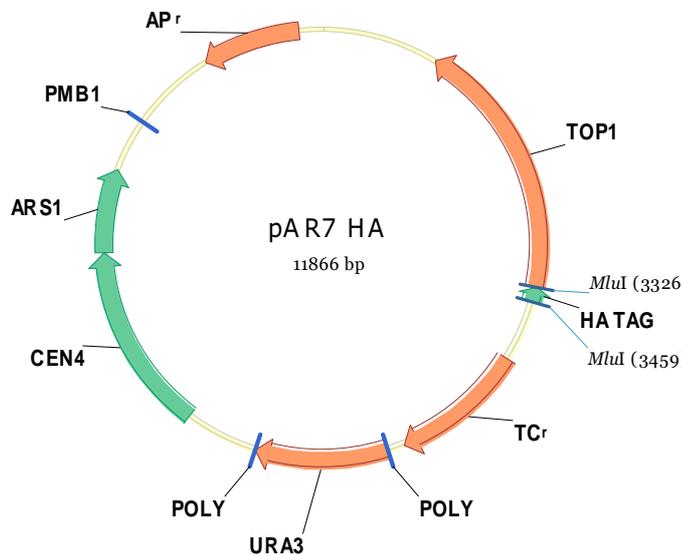
### 3.1.3. Plasmide pAR7HA

Analogamente alla costruzione del plasmide pCC10HA, allo scopo di ottenere una DNA Topoisomerasi I Y727F in grado di essere riconosciuta da un anticorpo diretto contro l'epitopo HA, abbiamo proceduto alla costruzione del plasmide pAR7HA. A tal fine si è partiti dall'inserto MluI-MluI ottenuto dalla digestrestrizione con l'enzima del plasmide pCR2.1-TOPO descritto nel paragrafo precedente. Tale frammento recante l'epitopo HA è stato inserito nel plasmide pAR7 effettuando una reazione di ligasi tra il plasmide linearizzato con MluI, defosforilato per evitarne la richiusura, e l'epitopo stesso tagliato con MluI. Con i prodotti delle reazioni, nei rapporti molari: 1:1, 2:1, 4:1, 8:1, è stato trasformato, tramite elettroporazione, il ceppo di *E.coli* Topo10 F'. Da 20 delle colonie ottenute si è estratto il DNA plasmidico. Si è controllato il corretto inserimento dell'inserto tramite reazione di PCR con i primer che si appaiano a monte dell'inserto per HA). La prima coppia dà origine ad un frammento di 361 bp la seconda coppia di 365 bp se il frammento si è inserito nell'orientamento corretto. Se l'inserto si inserisce in senso opposto, le coppie di primers utilizzate non sono in grado di dare origine ad un prodotto di amplificazione, perché risultano essere divergenti. Da tale analisi risultano essere positive tre colonie. Da una di queste colonie è stato estratto il plasmide e controllato tramite sequenziamento (figura 43): si osserva la presenza di una

delezione puntiforme a monte dell'ATG che, però, non compromette il corretto inserimento e frame dell'epitopo stesso. Il plasmide ottenuto è il pAR7HA (figura 44).



**Figura 43.** Allineamento della sequenza antisenso teorica di HA-Top1Y727F (linea superiore) e della sequenza antisenso del plasmide pAR7-HA (linea inferiore). In azzurro è evidenziata la sequenza dell'epitopo HA, in giallo i siti di restrizione di MluI, in rosso le ATG dell'epitopo HA da cui parte la traduzione in frame con l'ATG di Top1Y727F, in verde una delezione.



**Figura 44.** Mappa del plasmide pAR7HA.

### 3.2 Caratterizzazione del ceppo di lievito JEL1 $\Delta$ top1

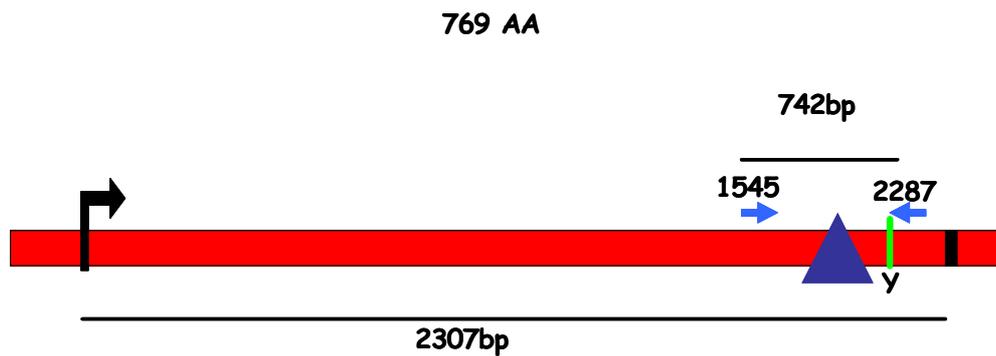
Il ceppo di lievito su cui sono stati condotti i nostri esperimenti è un ceppo di *S. cerevisiae*, JEL1 $\Delta$ top1 (79), che porta la delezione della Topoisomerasi I endogena ed il cui genotipo è MAT $\alpha$ , leu2, trp1, ura3-52, prb1-1122, pep4-3,  $\Delta$ HIS3::pGAL4,  $\Delta$ top1

Queste cellule sono state trasformate con i plasmidi su riportati per esprimere le Topoisomerasi IB wild type o mutata. Il ceppo JEL1 $\Delta$ top1 è stato quindi trasformato con uno dei seguenti plasmidi:

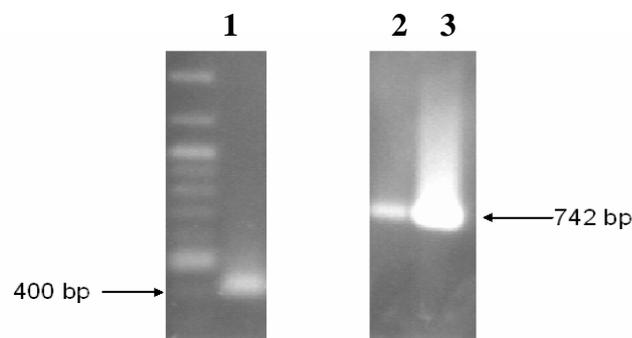
- pCC10 (derivato da YCp50 che esprime una Topoisomerasi I di lievito wild type sotto il controllo del suo promotore endogeno)
- pAR7 (derivato da pCC10 ma che esprime una Topoisomerasi I inattiva)
- YCp50 (plasmide controllo, a basso numero di copie)
- pCC10HA (derivato da pCC10 ma che esprime una Topoisomerasi I fusa in N terminale al tag di emoagglutinina)
- pAR7HA (derivato da pAR7 ma che esprime una Topoisomerasi I inattiva fusa in N terminale al tag di emoagglutinina)

Questo modello di studio è stato caratterizzato verificando il genotipo, la velocità di crescita in presenza/assenza di Top1 wt e mutata, i livelli di espressione e l'attività catalitica delle proteine.

La delezione a livello genomico del gene TOP1 (figura 45) è stata verificata tramite PCR (termociclo SeqYtop). Sono stati utilizzati due primers Leoyea1 e Leoyea2, posti rispettivamente a 1545 bp e 2287 bp dall'inizio della sequenza codificante, in grado di dare un prodotto di amplificazione di 742 bp sulla sequenza intera, di circa 400 bp nel caso in cui essa presenti la delezione (79). Come controllo positivo della PCR sono stati usati il DNA genomico estratto dal ceppo di lievito X4004-3a (MAT $\alpha$  lys5 trp1 met2 ura3) ed il DNA plasmidico di pCC10, i quali portano il gene TOP1 integro. Il risultato dimostra chiaramente che il ceppo JEL1 $\Delta$ top1 porta una delezione parziale del gene della Topoisomerasi IB che altera significativamente la sequenza codificante (Figura 46).



**Figura 45.** Mappa del locus del gene della Topoisomerasi IB sul cromosoma XII di *S. cerevisiae* Jel1 $\Delta$ top1 (MAT $\alpha$ , leu2, trp1, ura3-52, prb1-1122, pep4-3,  $\Delta$ HIS3::pGAL4,  $\Delta$ top1). IL triangolo blu indica la regione deleta, la barra verde indica la tirosina catalitica, la freccia nera indica il sito di inizio della trascrizione, le frecce blu indicano le posizioni dei primer Leoyea1(1545) e Leoyea2 (2287).



**Figura 46.** Corsa elettroforetica dei prodotti di PCR effettuata con i primer Leoyea1-Leoyea2 sul DNA genomico di Jel1 $\Delta$ top1 (pozzetto 1), sul DNA genomico di X4004-3A (pozzetto 2), sul DNA plasmidico di pCC10 (pozzetto 3).

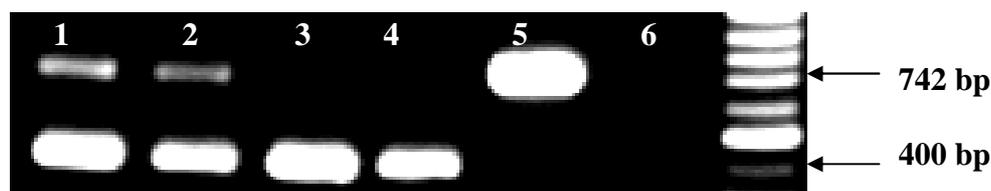
### 3.2.1 Controllo dei livelli di trascrizione della Topoisomerasi IB plasmidica

Abbiamo verificato che il gene plasmidico TOP1, espresso sotto il controllo del suo promotore endogeno, fosse effettivamente trascritto nei ceppi trasformati con i plasmidi pCC10 (wt), pAR7 (T727F) e YCp50 (Null). A tal fine è stata fatta una PCR con i primer Leoyea1-Leoyea2 su cDNA preparati a partire da RNA messaggero dei tre ceppi. Come controllo positivo della PCR sono stati usati il DNA genomico di JEL1 $\Delta$ top1 ed il DNA del plasmide pCC10.

I risultati indicano la presenza di due prodotti di PCR: uno di 742 bp ed uno di 400 bp; il primo corrisponde al DNA plasmidico di pCC10 (figura 47, pozzetto 5) e al cDNA plasmidico di JEL1 $\Delta$ top1 con pCC10 e di JEL1 $\Delta$ top1 con pAR7 (figura 47, pozzetti 1 e 2) ad indicare che il gene per Top1 plasmidico è presente ed è integro. Il prodotto a 400 bp corrisponde all'amplificazione del gene TOP1 nel genoma di JEL1 $\Delta$ top1 (pozzetto 4) e del cDNA dal ceppo JEL1 $\Delta$ top1 con pCC10, di JEL1 $\Delta$ top1 con pAR7 e JEL1 $\Delta$ top1 con YCp50 (pozzetto 1, 2, 3). I primer si appaiano anche sul gene TOP1 del genoma cellulare all'esterno del tratto che ha subito la modificazione, a dimostrare che il DNA genomico viene trascritto, dando luogo ad un frammento più corto di quello proveniente dal genoma wild type ad ulteriore prova della presenza della delezione.

Relativamente alla traduzione di questo trascritto non abbiamo indicazioni sul fatto che essa avvenga oppure no: in ogni caso il risultato potrebbe essere solo una proteina tronca ed inattiva, pertanto le cellule sono prive di una Top1 funzionale.

Inoltre, i risultati dimostrano che i geni TOP1 dei plasmidi pCC10 e pAR7 sono trascritti a livelli simili in cellule JEL1 $\Delta$ top1 di lievito.



**Figura 47.** Amplificazione del cDNA dei geni TOP1 plasmidici e del genoma cellulare. PCR su (pozzetto 1) JEL1 $\Delta$ top1 con il plasmide pCC10 (wt); (2) JEL1 $\Delta$ top1 con il plasmide pAR7 (Y727F); (3) JEL1 $\Delta$ top1 con il plasmide YCp50 (Null); (4) DNA genomico di JEL1 $\Delta$ top1; (5) DNA dal plasmide pCC10; (6) controllo negativo.

### 3.2.2 Controllo dei livelli di espressione di Topoisomerasi I

Confermata la presenza dell'mRNA del gene TOP1 plasmidico wild type e con la mutazione Y727F, abbiamo controllato quali fossero i livelli di espressione delle proteine tramite Western blotting successivo ad immunoprecipitazione dall'estratto proteico totale dei ceppi JEL1 $\Delta$ top1 con il plasmide pCC10-HA, JEL1 $\Delta$ top1 con il plasmide pAR7-HA e JEL1 $\Delta$ top1 con il plasmide YCp50.

L'immunoprecipitazione ed il Western blotting sono stati effettuati con l'anticorpo 12CA5 (specifico per il riconoscimento del tag di emoagglutinina). Il risultato, in figura 48, mostra che solo i ceppi wt e Y727F codificano per una proteina riconosciuta dall'anticorpo, e che le due proteine sono espresse agli stessi livelli.



**Figura 48.** Western Blotting dopo immunoprecipitazione da estratto proteico totale del ceppo JEL1 $\Delta$ top1 con il plasmide pCC10-HA (pozzetto 1), JEL1 $\Delta$ top1 con il plasmide pAR7-HA (2) e JEL1 $\Delta$ top1 con il plasmide YCp50 (3).

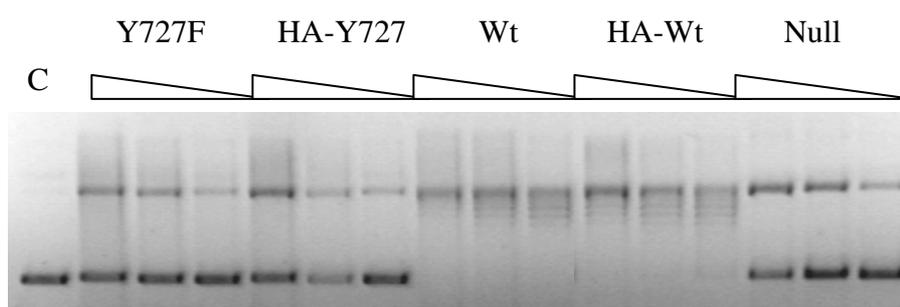
### 3.2.3. Controllo dell' attività catalitica della Topoisomerasi IB in estratti cellulari

Abbiamo verificato l'attività catalitica delle Topoisomerasi I espresse nel nostro sistema mediante un saggio enzimatico che verifica l'attività rilassante della proteina in assenza di ATP, escludendo, dunque, il contributo da parte della topoisomerasi II che richiede ATP durante il processo di catalisi.

L'attività catalitica di Top1 è stata valutata nei ceppi JEL1 $\Delta$ top1 con il plasmide pCC10, pAR7, YCp50 e per valutare gli eventuali effetti del tag anche nei ceppi con il plasmide pCC10-HA e pAR7-HA. I risultati in figura 49 indicano che solo Top1 wt e HA-Top1 wt hanno attività rilassante: a concentrazioni maggiori dell'estratto proteico è possibile osservare il totale rilassamento del plasmide superavvolto, man mano che la concentrazione diminuisce l'effetto diventa più graduale ed è possibile vedere la presenza di topoisomeri intermedi, non rilassati completamente.

Nell'estratto proteico dai lieviti con pAR7, pAR7-HA e YCp50 è possibile osservare la mancanza totale di attività rilassante, dovuta all'inattività catalitica della proteina (pAR7 e pAR7-HA) o alla sua assenza (YCp50).

Il risultato indica, inoltre, che il tag HA non ha influenza sulla presenza di tale attività (pCC10) o sulla sua assenza (pAR7).



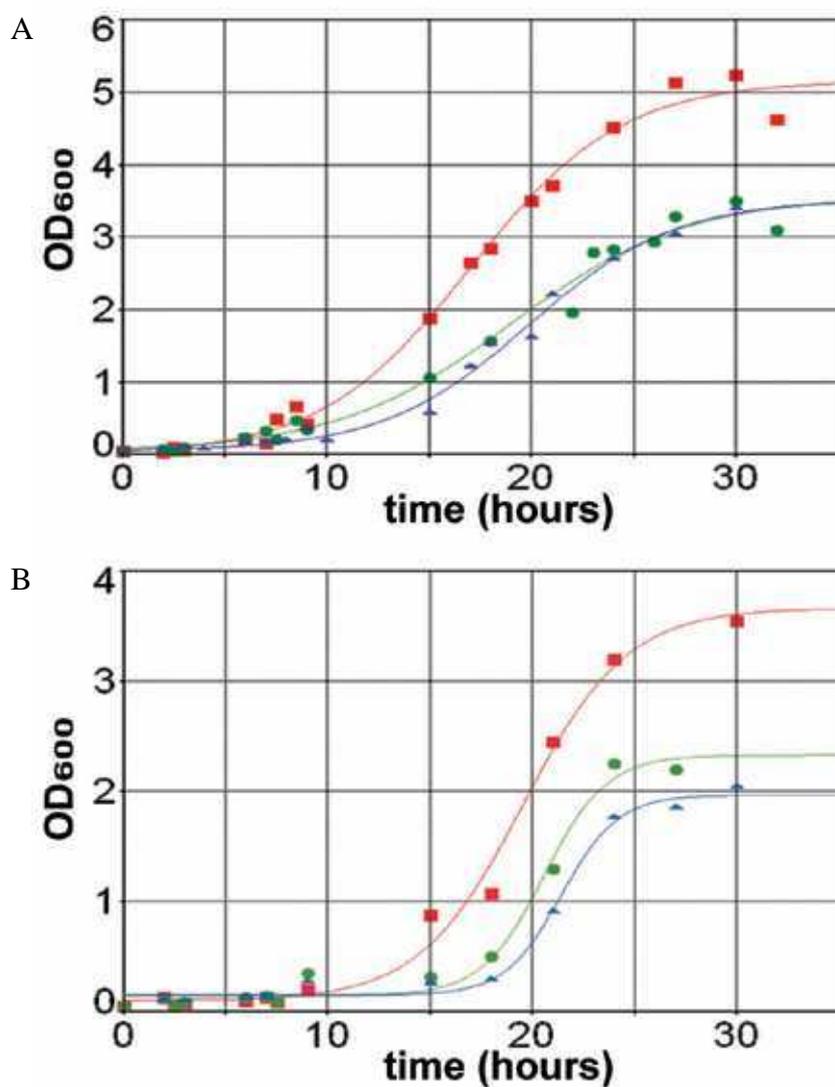
**Figura 49. Test per l'attività rilassante di Top1. C: DNA plasmidico di controllo non esposto ad estratti proteici. Successivamente, DNA plasmidico con concentrazioni decrescenti di estratto proteico da JEL1 $\Delta$ top1 con il plasmide pAR7, pAR7-HA, pCC10, pCC10-HA e YCp50.**

### 3.2.4. Effetto della Topoisomerasi I sulla cinetica di crescita

L'effetto di Top1 sulla cinetica di crescita è stato valutato confrontando le curve di crescita dei ceppi JEL1 $\Delta$ top1 con il plasmide pCC10, pAR7, YCp50. E' noto che l'enzima non è essenziale in *S. cerevisiae* perché Top2 ne ripristina integralmente le funzioni (9), pertanto Top1 ha un effetto moderato sulla crescita di lievito.

Le cinetiche di crescita sono state valutate in un terreno selettivo senza uracile (poiché tutti i plasmidi derivati da YCp50 portano il marcatore di selezione URA3 per l'auxotrofia in terreno sintetico completo mancante di uracile) a pH 6.2 (ura-) o tamponato con HEPES 24 mM a pH=7.5 (ura- con HEPES). Il primo rappresenta le condizioni ottimali di crescita per i lieviti, il secondo è comunemente usato per trattamenti cellulari con CPT, per ridurre l'inattivazione del farmaco a pH bassi durante la crescita cellulare (20). In entrambi i casi la concentrazione di glucosio utilizzata è del 2%.

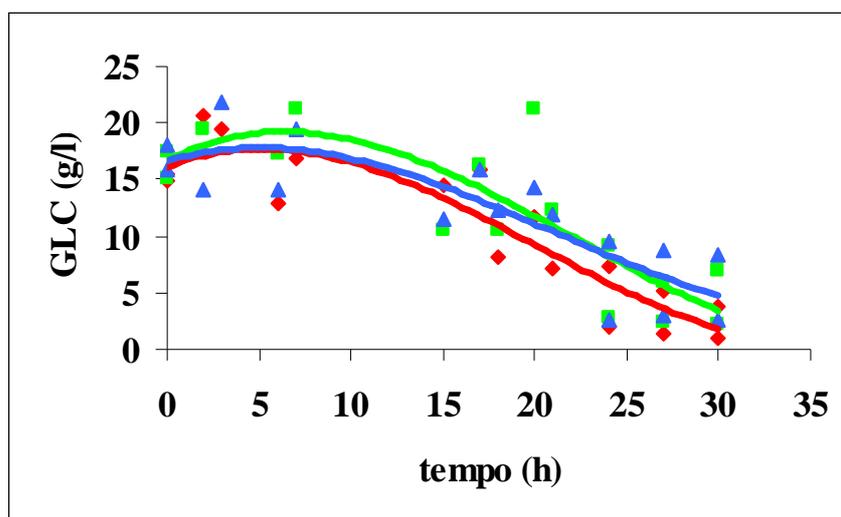
I risultati in figura 50A indicano che le cellule con Top1 wt crescono più velocemente nella fase esponenziale e raggiunge un numero più alto di cellule in fase stazionaria rispetto alle cellule senza l'enzima o con un enzima mutato che seguono un andamento più lento e un ritardo iniziale più lungo in terreno sintetico completo ura-. Anche se la crescita cellulare è un po' rallentata, le cellule che esprimono Top1 wt crescono più velocemente anche in terreno sintetico completo ura- con HEPES (figura 50B). Questi risultati indicano che Top1 wt conferisce una crescita più rapida ed ottimale delle cellule di lievito nelle comuni condizioni di laboratorio.



**Figura 50.** Curve di crescita di JEL1Δ con pCC10 (rosso), pAR7 (blu) e YCp50 (verde). Le colture sono state incubate a 30°C, 170 rpm in terreno SC ura- pH 6.2 (25A) e ura- con HEPES (25B) partendo dalla stessa densità ottica (0.05) al tempo  $t=0$ . A tempi successivi (h) è stata misurata la densità cellulare della coltura (OD<sub>600</sub>). Le barre indicano gli errori standard per i valori per i quali è stata fatta più di una determinazione.

Visto che a parità di concentrazione di glucosio iniziale nel terreno di coltura i lieviti che esprimono la Topoisomerasi IB crescono in maniera più efficiente rispetto a quelli che non esprimono l'enzima o esprimono quello mutato, si è pensato di valutare

la cinetica del consumo di glucosio durante la crescita di tali lieviti. Per fare ciò è stata valutata la concentrazione di glucosio restante nel mezzo di coltura quando le cellule vengono lasciate crescere in ura- che inizialmente presenta una concentrazione dello zucchero pari al 2%. Dalla figura 51 si può notare che il consumo di glucosio è identico per i tre ceppi nonostante il fatto che le cellule non aventi la Topoisomerasi I o quelle che la possiedono mutata mostrino una cinetica di crescita rallentata rispetto alle cellule che possiedono un enzima attivo. Sembra che le cellule non recanti una proteina funzionante non siano in grado di effettuare un corretto consumo di glucosio, ottimizzandolo per la loro crescita.



**Figura 51.** Curve della concentrazione di glucosio presente nel terreno di coltura durante la crescita di JEL1 $\Delta$ top1 con pCC10 (rosso), pAR7 (blu) e YCp50 (verde). Le colture sono state incubate a 30°C, 170 rpm in terreno SC (URA-) al 2% di glucosio, partendo dalla stessa densità ottica (0.05) al tempo t=0. A tempi successivi è stata misurata la concentrazione di glucosio (g/l).

### **3.3. Analisi dei profili di espressione influenzati da Top1 in cellule di *S. cerevisiae* in fase esponenziale di crescita**

Per indagare il ruolo della Topoisomerasi IB abbiamo determinato tramite DNA microarrays i livelli globali dei trascritti in cellule JEL1 $\Delta$ top1 che esprimono Top1 wt ed in cellule JEL1 $\Delta$ top1 senza l'enzima.

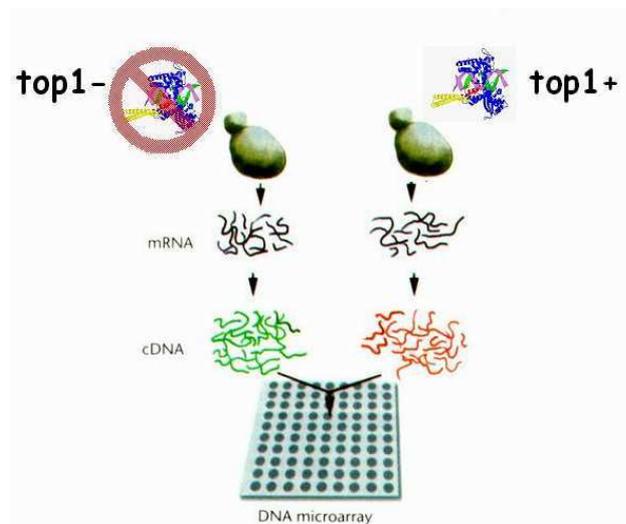
#### **3.3.1. Procedure sperimentali, tipi di vetrini e normalizzazione**

Abbiamo preparato il cDNA dalla frazione di RNA totale di cellule raccolte in uno stadio precoce della fase esponenziale, corrispondente a 10 ore della figura 50A, in terreno sintetico completo ura- con glucosio al 2%. In ogni esperimento tutti i campioni di cellule sono costituiti da pool di colture distinte allo scopo di diminuire la variabilità sperimentale in questi tipi di esperimenti. Come è indicato schematicamente dalla figura 52 la preparazione dei campioni prevede l'estrazione dell'RNA totale dalle colture di lievito di cui si vuole valutare l'espressione, la purifica dell'RNA messaggero, la retrotrascrizione a cDNA in presenza di aminoallil UTP, la marcatura indiretta con l'ausilio di fluorocromi derivati della succinimide, e l'ibridazione di entrambi i campioni sulla stessa matrice dell'array. I fluorocromi usati sono esteri di Cy3 e Cy5. Le strutture chimiche dei fluorocromi sono indicate nella figura 53.

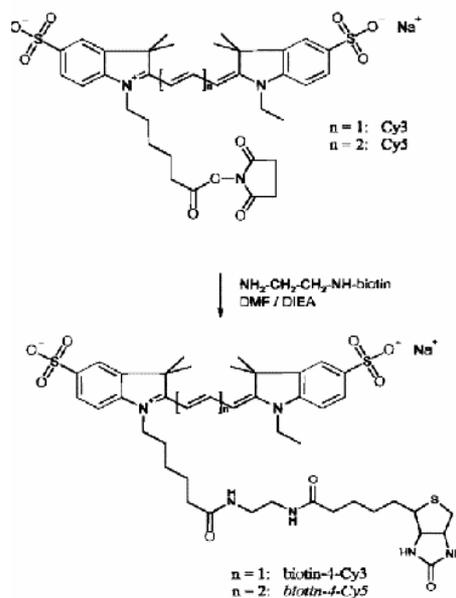
Ogni vetrino a cDNA (gentilmente forniti da D. Cavalieri, Harvard University, Cambridge, MA, USA) contiene due matrici identiche di arrays. Il numero degli spots è di 6720, di cui 6155 sono le ORF di lievito, e i restanti sono controlli interni, spots bianchi o vuoti.

La fluorescenza del DNA è rilevata con lo scanner per microarray GenePix 4000, ed è stato usato il software GENEPIX 4000 per dare una corrispondenza agli spot localizzati sul vetrino. I dati che si ottengono con l'ibridazione sono costituiti da una matrice derivata dai rapporti delle intensità di fluorescenza degli spots, ottenuti con la scansione del vetrino nelle due lunghezze d'onda di emissione dei due fluorofori (635 nm per il Cy5 e 532 nm per il Cy3). Per evitare di ottenere valori falsi positivi di over-espressione dovuti alla presenza di valori vicini allo zero al denominatore, l'intensità di ciascuno spot è normalizzata considerando l'intensità mediana di tutti i pixel che lo compongono

a cui è sottratto un valore di background locale. Ogni spot è escluso dall'analisi se i segnali di fluorescenza da Cy3 e Cy5 hanno una deviazione standard pari a 2 dalla distribuzione delle intensità del background. Il rapporto segnale totale di Cy3 / segnale totale di Cy5 è stato calcolato per ottenere un fattore di normalizzazione tra i due fluorofori che poi viene applicato a ciascuno spot in modo che la media dei valori dai fluorofori Cy3 e Cy5 sia la stessa.



**Figura 52.** rappresentazione schematica della procedura sperimentale per i DNA microarray. Figura ura modificata da Nature genetics Vol.11 Jan 1999 pag.3



**Figura 53.** Struttura chimica dei due fluorocromi incorporati nel cDNA per marcatura indiretta.

Fra i dati ottenuti, abbiamo considerato significativi quelli con fold change maggiore o uguale al valore soglia 1.8: perciò rapporti  $>1.8$  indicheranno up-regolazione della trascrizione, mentre i valori  $<0.56$  saranno indice di down-regolazione. I rapporti intermedi indicano geni la cui espressione non risulta influenzata nelle nostre condizioni sperimentali.

### **3.3.2. Confronto dei livelli di trascrizione in ceppi di lievito che esprimono la Topoisomerasi IB wild type rispetto a ceppi privi dell'enzima**

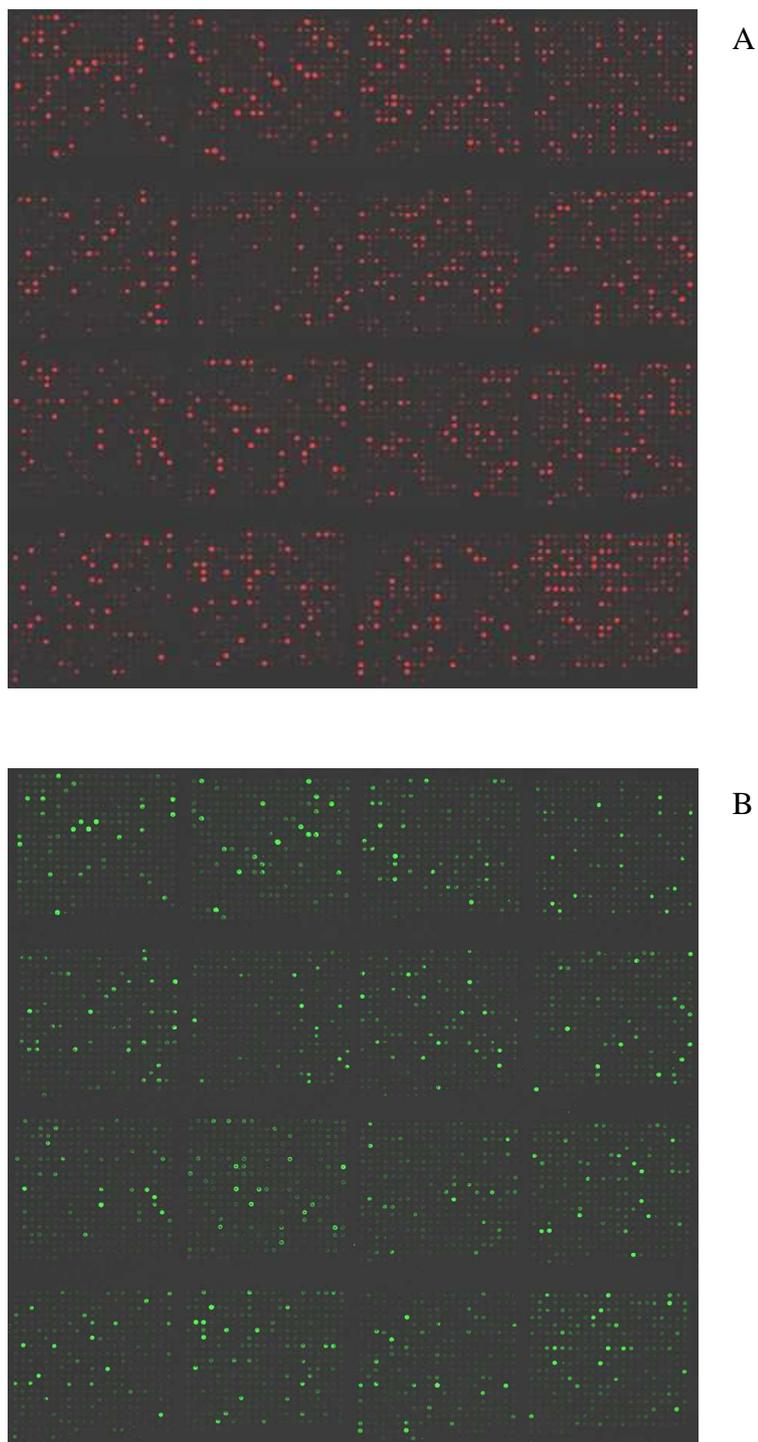
L'analisi della variazione dell'espressione genica nel ceppo di lievito che ha la Topoisomerasi I plasmidica rispetto al ceppo senza la proteina è stata fatta in duplicato sullo stesso vetrino. Dalla scansione dei vetrini si ottengono delle tipiche immagini rosso/verdi corrispondenti rispettivamente alla lunghezza d'onda di 635 nm per Cy5 (Figura 54A) e alla lunghezza d'onda di 532 nm per il Cy3 (Figura 54B). La sovrapposizione delle due immagini (Figura 55) indica visivamente i geni non alterati (gialli) quelli up-regolati (rossi) o down-regolati (verdi).

L'analisi dei rapporti delle intensità e del loro valore di significatività statistica mostra che il numero di geni valutabili è molto alto ed il 9% di essi mostra un'espressione aumentata o diminuita da parte di Top1 di un fattore pari o maggiore a 1.8 (tabella 3).

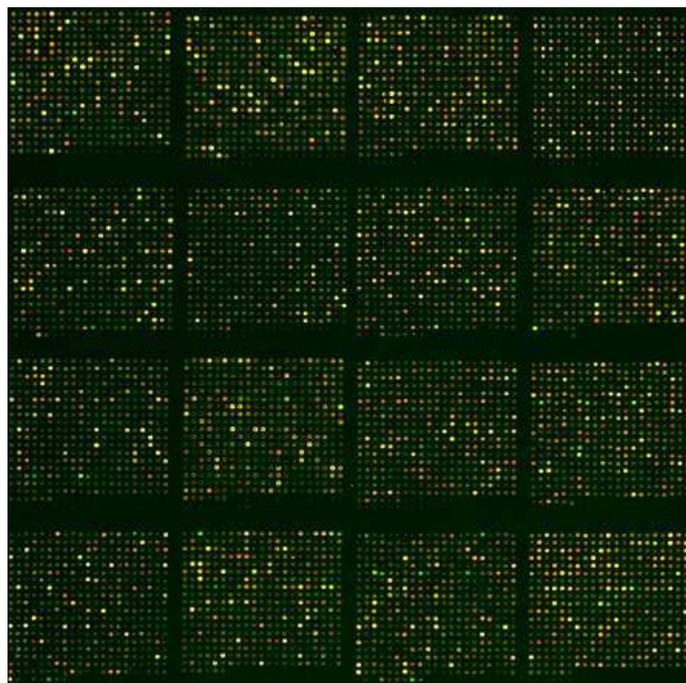
In particolare, l'espressione di 343 e di 237 geni è aumentata e diminuita, rispettivamente, più di 1.8 volte; di essi, 47 e 63 sono up e down-regolati, rispettivamente, di più di 3 volte da Top1 wt. In appendice, le tabelle A e B riportano rispettivamente l'elenco dei geni che risultano up e down regolati, con il valore di fold change e la descrizione biologica.

Geni totali	Up - regolati	Down – regolati
6155	344 (5.6 %)	237 (3.8 %)

**Tabella 3. Numero di geni i cui livelli di trascrizione sono modulati da Top1.**



**Figura 54:** Immagini relative ad un esperimento di ibridizzazione con cDNA in presenza/assenza di topoisomerasi I. La figura A mostra l'intensità di fluorescenza per ciascuno spot nella lunghezza d'onda a 635 nm; la figura B mostra l'intensità di fluorescenza per ciascuno spot nella lunghezza d'onda a 532 nm.



**Figura 55. Immagine ottenuta dalla sovrapposizione delle scansioni nelle due lunghezze d'onda.**

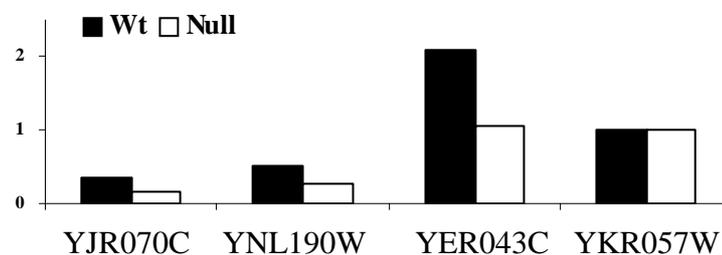
Questi numeri indicano una marcata influenza della Topoisomerasi I sulla trascrizione globale dipendente dalla RNA polimerasi II nelle condizioni sperimentali utilizzate.

### 3.3.3. Conferma tramite PCR real-time quantitativa dei risultati di trascrizione ottenuti dall'analisi con microarray

Su alcuni dei geni la cui espressione risulta alterata dall'analisi con microarray, abbiamo svolto un'analisi quantitativa con real-time PCR per verificare e confermare le alterazioni dei livelli di trascritto precedentemente indicate.

Sperimentalmente, abbiamo proceduto come per l'analisi con microarray, abbiamo infatti preparato il cDNA dalla frazione di mRNA di cellule raccolte in uno stadio precoce della fase esponenziale, corrispondente a 10 ore della figura 50A, in terreno sintetico completo ura- con glucosio al 2%. La preparazione dei campioni prevede l'estrazione dell'RNA totale dalle colture di lievito di JEL1 $\Delta$ top1 che esprimono Top1 wt e senza l'enzima, la purifica dell'RNA messaggero, la retrotrascrizione a cDNA e l'analisi quantitativa con real-time PCR su 3 geni (YJR070C, YNL190W e YER043C) scelti per il loro alto livello di trascrizione e per il valore di fold change superiore a 3. La posizione in 3' del gene YHR057W è stata scelta per controllo, in quanto si tratta di un gene i cui livelli di espressione risultano non alterati da Top1. I valori ottenuti, espressi in ng e quantificati su una curva di DNA genomico, sono stati normalizzati fissando arbitrariamente ad 1.00 i valori del gene di controllo per ciascun ceppo; in ordinata, pertanto, sono riportate delle unità arbitrarie.

La figura 56 indica i livelli trascritto in presenza di Top1 (istogramma nero) ed in assenza dell'enzima (istogramma bianco): i risultati sono concordi con le alterazioni di espressione genica individuate tramite microarray.



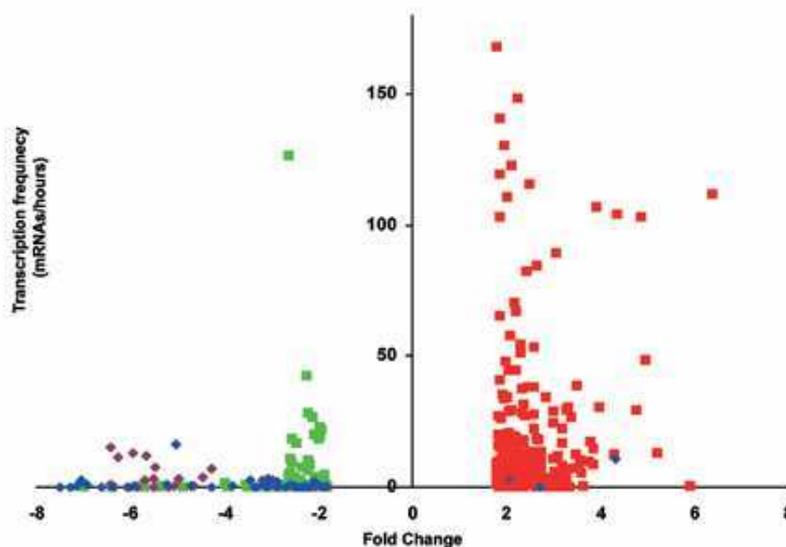
**Figura 56. Analisi quantitativa tramite real-time PCR dei livelli di trascritto in cellule con Top1 wt e in assenza di Top1.**

### 3.3.4. Top1 e frequenza di trascrizione

Se la Topoisomerasi I ha un ruolo critico nel rilassare i superavvolgimenti generati durante la trascrizione, la sua presenza cellulare potrebbe influenzare positivamente i geni con alta frequenza di trascrizione (9; 33).

Perciò abbiamo messo in relazione i valori di fold change, ottenuti dall'analisi con microarray, con la frequenza di trascrizione, la lunghezza dei trascritti ed altre caratteristiche dei geni ([web.wi.mit.edu/young/expression/transcriptome.html](http://web.wi.mit.edu/young/expression/transcriptome.html)) e abbiamo verificato che i geni più frequentemente trascritti sono preferenzialmente up regolati (figura 57), mentre non c'è nessuna relazione tra fold change e le altre caratteristiche osservate. Tra i 37 geni con espressione alterata e frequenza di trascrizione più alta di 50 mRNA/ora, 34 sono up regolati e solo 3 down regolati; abbiamo notato, inoltre, una marcata tendenza dei geni con bassa frequenza di trascrizione (meno di 0.8 mRNA/ora) ad essere down regolati.

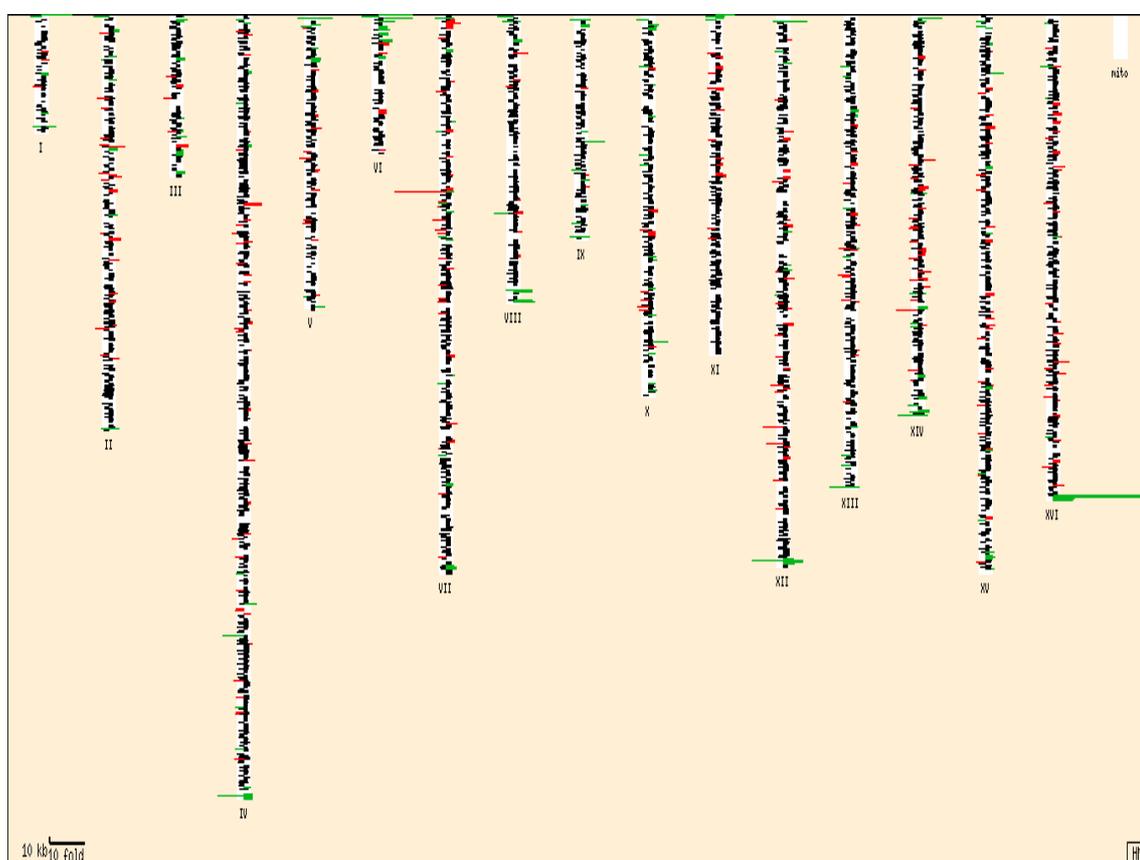
Queste considerazioni potrebbero essere consistenti con il ruolo rilassante di Top1 nella fase di elongazione durante la trascrizione in caso di geni altamente trascritti, sebbene la preferenziale down regolazione dei geni con bassa frequenza di trascrizione non possa essere spiegata semplicemente con tale ruolo.



**Figura 57.** Distribuzione in funzione della frequenza di trascrizione (mRNA/ore) dei geni alterati da Top1. In rosso e verde sono rappresentate rispettivamente le ORF up regolate e down regolate, in blu e viola le ORF posizionate rispettivamente nelle regioni subtelomeriche e telomeriche.

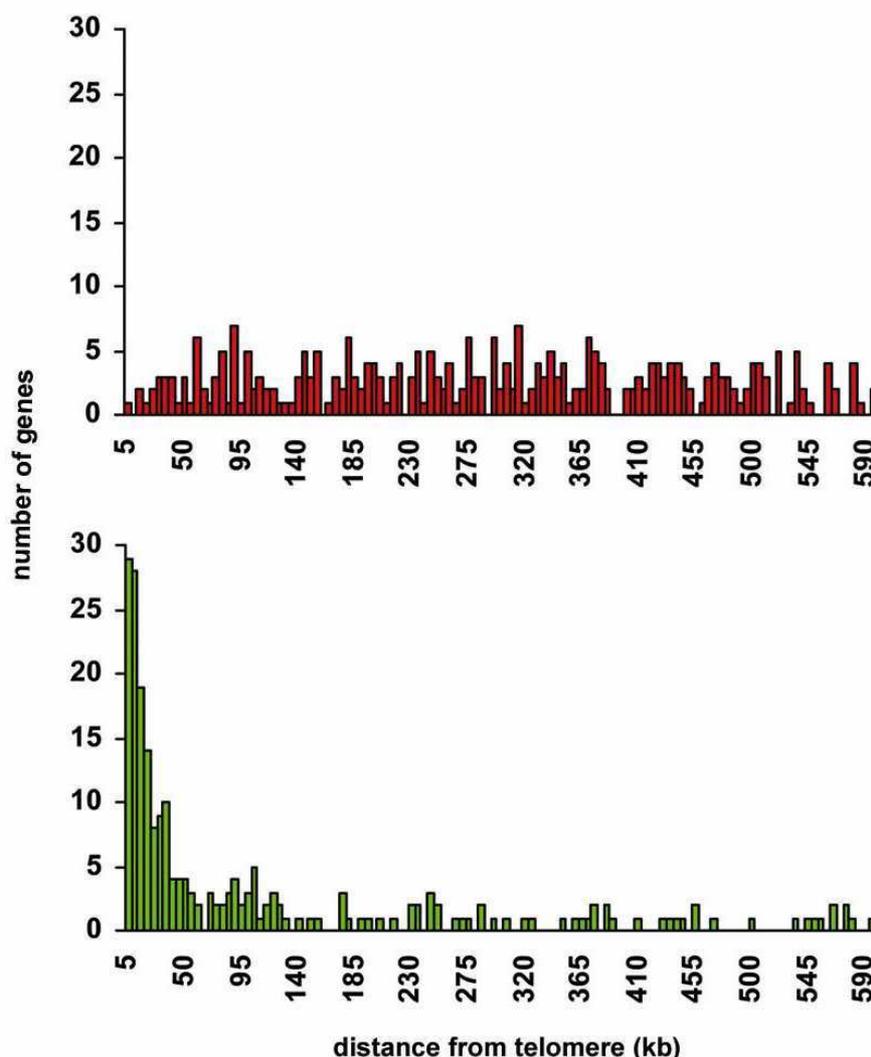
### 3.3.5. Top1 reprime cluster di geni vicini al telomero

Valutando la localizzazione cromosomica dei geni alterati da Top1, abbiamo trovato che i geni up e down regolati mostrano differenze molto significative. I geni down regolati sono stati localizzati in cluster nelle regioni telomeriche e subtelomeriche mentre i geni up regolati sono uniformemente dispersi lungo i cromosomi (figura 58).



**Figura 58.** Distribuzione dei geni alterati da Top1 lungo l'intero genoma di lievito. L'immagine è stata creata con il software "Genome expression mapper" (<http://atlas.med.harvard.edu/expmapper/>)

La distribuzione dei geni alterati in funzione della distanza dal telomero più vicino del cromosoma su cui si trovano mostra una marcata differenza fra i due set di geni come rappresentato in figura 59.



**Figura 59.** Distribuzione dei geni alterati da Top1. il numero di geni alterati (in rosso quelli up regolati, in verde quelli down regolati) è diagrammato in funzione della distanza dal telomero.

In particolare il 50% dei geni down regolati si localizzano nelle 35 kbp dai telomeri (tabella 4). Top1 reprime il 59% dei geni telomerici ed il 30% dei subtelomerici mentre up regola solo l'1-2% dello stesso gruppo di geni. Questa percentuale è significativamente diversa dalla frequenza attesa (5.6% e 3.8% per i geni up e down regolati, rispettivamente) con un valore  $\chi^2$  minore di 0.001.

Questi risultati dimostrano, dunque, che Top1 ha uno specifico ruolo repressivo alle terminazioni dei cromosomi di lievito nelle condizioni di crescita ottimali e all'inizio della fase di crescita esponenziale.

<b>Intervallo (kbp)</b>	<b>0-5</b>	<b>5-15</b>	<b>15-35</b>	<b>&gt;35</b>	<b>Totale</b>
ORF totali nell'intervallo <sup>a</sup>	49	158	265	5683	6155 <sup>b</sup>
geni up-regolati	1 (2%)	2 (1.3%)	9 (3.4%)	327 (5.8%)	344 (5.5%)
geni down-regolati	29 (59%)	47 (30%)	41 (15%)	115 (2%)	237 (3.8%)

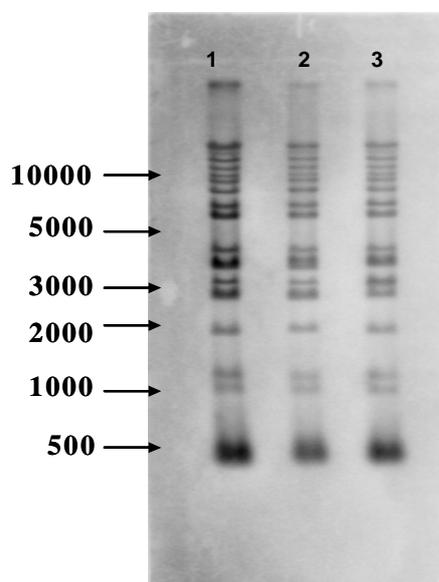
**Tabella 4. Distribuzione lungo i cromosomi dei geni alterati da Top1. Gli intervalli indicano la distanza dei geni dal telomero. La percentuale è calcolata relativamente al numero di geni nell'intervallo.**

<sup>a</sup> Numero dello ORF presenti nell'intervallo indicato e spottate sul vetrino.

<sup>b</sup> Il numero totale di ORF nucleari nel database di SGD è 6576 nell'ultimo update (ottobre 2006).

### 3.3.6. Ruolo di top1 sulla stabilità dei telomeri

E' noto che Topoisomerasi I contribuisce alla stabilità del locus dell'rDNA. L'osservazione che l'espressione di un gran numero di geni telomerici e subtelomerici risulta diminuita in presenza di Top1, potrebbe suggerire che l'enzima possa essere coinvolto in meccanismi di silenziamento che potrebbero sia reprimere la trascrizione dei geni subtelomerici/telomerici sia aumentare la stabilità dei telomeri impedendo eventi di riarrangiamento genomico. Abbiamo pertanto valutato la presenza di eventuali riarrangiamenti del DNA telomerico tramite Southern blotting (figura 60) in cellule che esprimono Top1 wt, Top1 Y727F e che mancano dell'enzima. I risultati mostrano in modo chiaro che non vi sono consistenti riarrangiamenti a livello delle sequenze ripetute dei telomeri delle cellule che mancano dell'enzima o con enzima mutato rispetto a cellule con l'enzima wild type. La Top1, quindi, non è essenziale per la stabilità dei telomeri in lievito almeno nelle condizioni sperimentali saggiate.



**Figura 60. Stabilità delle regioni telomeriche in cellule con o senza una Top1 attiva. DNA genomico estratto da cellule JEL1 $\Delta$ top1 con il plasmide pCC10 (1), con il plasmide YCp50 (2), con il plasmide pAR7 (3). Come sonda si è utilizzata la sequenza del frammento ripetuto (poly C<sub>1-3</sub>A) dei telomeri di lievito.**

### 3.3.7. Top1 aumenta l'espressione dei geni del metabolismo del glucosio e del metabolismo energetico

L'analisi dei livelli di alterazione con il software Pathway Processor (80), usando il "KEGG pathway database", ha indicato quali sono i percorsi metabolici alterati da Top1 in cellule di lievito in fase di crescita esponenziale.

In tabella 5 sono indicati i percorsi alterati da Top1 con il valore di significatività statistica (Fisher Exact Test  $<0.002$ ). La seconda colonna indica il numero di geni che fanno parte del percorso; la terza il numero di geni che sono alterati in quanto superano il livello soglia (-1.8, 1.8); la quarta colonna indica la probabilità che un certo numero di geni del percorso biochimico considerato risulti alterato in maniera casuale; la quinta colonna calcola il valore di alterazione dei geni in confronto ai geni che non rientrano in un particolare percorso metabolico.

L'analisi indica che il metabolismo del glucosio ed il metabolismo energetico sono aumentati da Top1, in particolare la glicolisi ed i percorsi metabolici a valle del ciclo di Krebs. L'analisi ha rivelato anche che il metabolismo del galattosio è ridotto da Top1, in maniera coerente con l'aumento dell'utilizzazione del glucosio.

Percorsi metabolici	N° geni totali	N° geni alterati	Fisher Exact Test	Livello di alterazione
Glicolisi / Gluconeogenesi	39	16	8.50E-05	0.950507
Metabolismo del galattosio	29	12	5.98E-04	- 0.85687
Fosforilazione ossidativa	61	19	0.001233	1.016904
Metabolismo del propanoato	10	6	0.001471	0.507279
Sintesi di ATP	24	10	0.001607	1.091375

**Tabella 5. Percorsi metabolici alterati da Top1 in cellule di lievito in fase di crescita esponenziale.**

La valutazione delle caratteristiche funzionali di Gene Ontology (GO; 81) con il tool GO Term Finder ([www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)) ha mostrato che tra i geni la cui espressione risulta aumentata, il processo GO più significativo è la generazione di metaboliti precursori e di energia, seguito dal metabolismo degli acidi carbossilici, il metabolismo degli acidi organici e la fosforilazione ossidativa. La funzione GO più significativa è l'attività di ossidoreduttasi. L'analisi dei componenti cellulari GO indica la membrana mitocondriale e le membrane degli organelli citoplasmatici come la localizzazione principale dei geni up regolati. L'analisi GO dei geni la cui espressione risulta ridotta indica funzioni e processi significativi correlati al trasporto degli esosi dopo l'esclusione, però, di molti geni down regolati con caratteristiche "sconosciute", suggerendo che Top1 reprime i geni responsabili dell'importo cellulare di zuccheri alternativi, che sono collocati spesso nelle regioni sub-telomeriche.

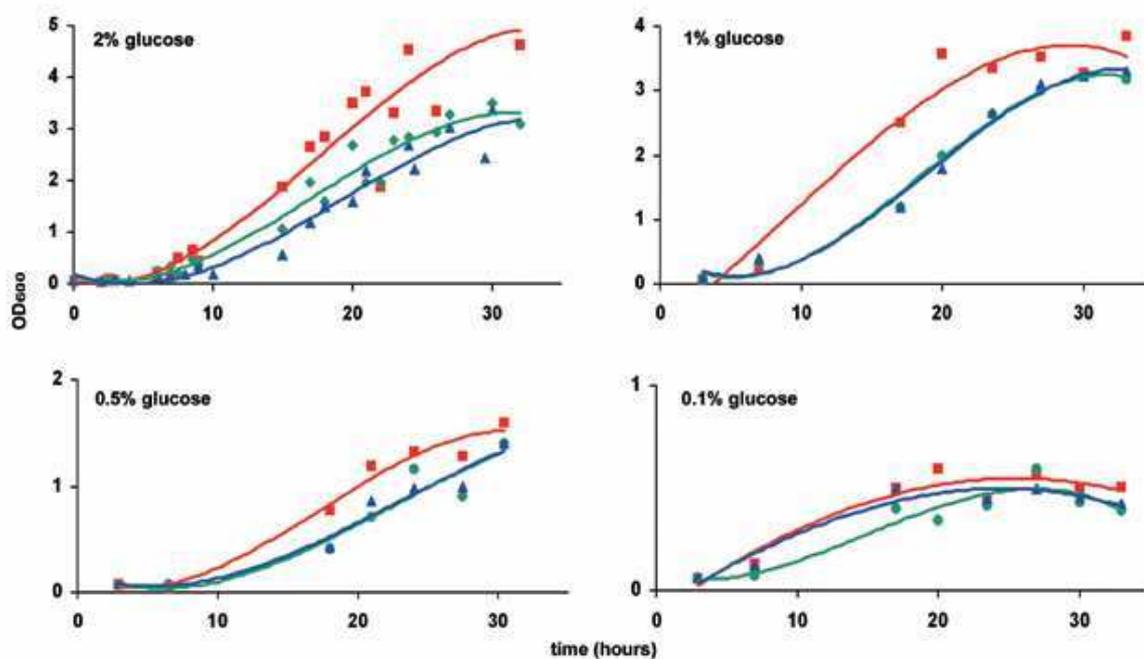
Questi risultati sono coerenti con l'aumento da parte di Top1 dell'utilizzazione del percorso metabolico del glucosio per la produzione di energia, e con la repressione dell'utilizzazione degli zuccheri alternativi e dell'espressione dei geni sub-telomericici.

Poiché nelle nostre condizioni sperimentali le cellule crescono in un terreno al 2% di glucosio, ci siamo chiesti se la concentrazione di glucosio potesse avere un qualche effetto sulla crescita cellulare dei lieviti con diverse varianti di Top1. Così, le cellule che esprimono Top1 wt, Top1 inattiva o che non esprimono Top1 sono state cresciute in terreno sintetico completo ura- con diverse concentrazioni di glucosio (figura 61).

I risultati indicano che concentrazioni decrescenti di glucosio sopprimono in modo progressivo la diversa velocità di crescita delle cellule che esprimono Top1 wt rispetto alle cellule senza enzima o con l'enzima inattivo. La concentrazione cellulare di nucleotidi resta non modificata nelle diverse condizioni di crescita (dati non mostrati), indicando che il bilancio ATP/ADP/AMP non viene influenzato. Top1, dunque, aumenta la velocità di crescita in maniera glucosio-dipendente incrementando la trascrizione dei geni correlati al consumo del glucosio e alla produzione di energia.

L'insieme di questi risultati permette di tracciare una prima conclusione sulle funzioni cellulari di Top1. L'enzima ottimizza i profili di trascrizione durante la crescita cellulare nelle comuni condizioni di crescita di laboratorio, aumentando il consumo di glucosio e la produzione di energia, e reprimendo i geni che non sono necessari (come quelli che si localizzano vicino ai telomeri). Inoltre, in condizioni di stress da pH, Top1

non mostra una specifica down regolazione dei geni telomerici e subtelomerici e non aumenta l'espressione dei geni per il consumo del glucosio e del metabolismo energetico nelle condizioni ottimali di crescita cellulare (dati non mostrati).



**Figura 62.** Analisi delle cinetiche di crescita di JEL1 $\Delta$ top1 che esprime Top1 wt (in rosso), di JEL1 $\Delta$ top1 che esprime Top1 mutata (in blu) e di JEL1 $\Delta$ top1 che non esprime Top1 (in verde), a diverse concentrazioni di glucosio nel mezzo di coltura.

### 3.4. Top1 si localizza ed è cataliticamente attiva nelle ripetizioni telomeriche in cellule di *S. cerevisiae*

I profili di espressione allo stato stazionario possono essere determinati da una regolazione diretta mediata da Top1 sui geni target e/o da effetti secondari. Poiché Top1 ha un effetto repressivo specifico sui geni subtelomerici, ci siamo domandati se Top1 possa essere coinvolta direttamente nel meccanismo di silencing telomerico in lievito dipendente dai complessi SIR, Rap1p ed altri fattori (75).

#### 3.4.1. Top1 interagisce fisicamente con le regioni telomeriche e sub-telomeriche in JEL1Δtop1

Per determinare se Top1 possa interagire fisicamente con la cromatina nelle regioni telomeriche e sub-telomeriche, abbiamo usato la tecnica dell'immunoprecipitazione della cromatina (ChIP).

Abbiamo selezionato una regione di circa 12000 bp sul braccio destro del cromosoma XIV che comprende le ripetizioni telomeriche (figura 63): all'interno di questa regione, 5 delle 6 ORF subiscono un aumento dell'espressione genica da Top1 (cfr. la tabella A in appendice).

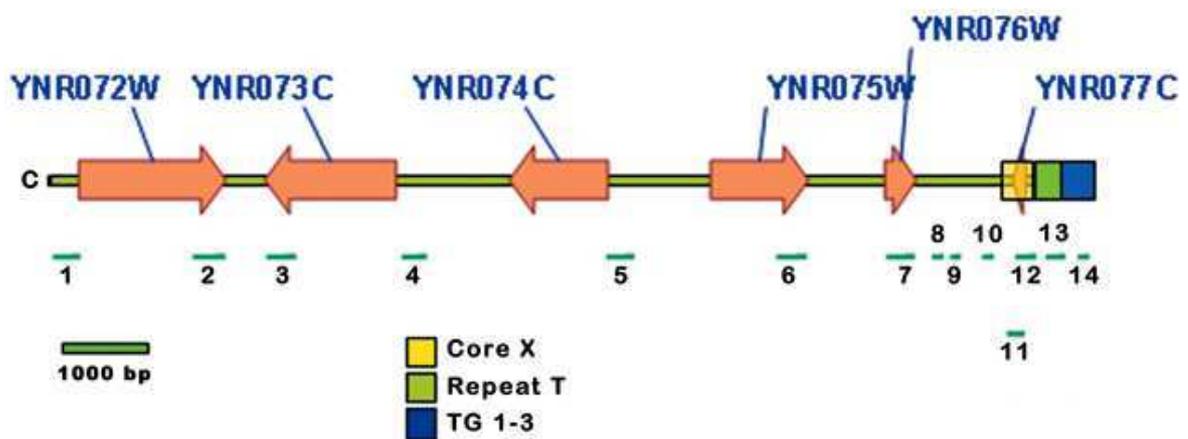


Figura 63. Mappa del telomero XIVR. 1-14: frammenti di DNA amplificati con real-time PCR dopo ChIP.

La figura 63 riporta la mappa delle regioni analizzate per l'interazione fisica di Top1: in arancio sono rappresentate le ORF; il telomero, che si estende per 1000 bp circa, è localizzato nelle regioni indicate come Core X in giallo, Repeat T in verde e TG<sub>1-3</sub> in blu. I segmenti da 1 a 14 indicano i frammenti amplificati con real-time PCR dopo ChIP, si tratta di regioni in 3' dei geni (2, 3, 6, 7, 11, 12), nel promotore (1, 4, 5) o in sequenze intergeniche (8, 9, 10, 13, 14), posizionate nel subtelomero (1-11) e nel telomero (12-14).

Abbiamo svolto le analisi di ChIP in condizioni sperimentali identiche a quelle degli esperimenti per valutare i profili di espressione, nelle cellule di JEL1Δtop1 che esprimono HA-Top1 wt, HA-Top1 Y727F e che non esprimono Top1, utilizzando i plasmidi pCC10-HA e pAR7-HA (precedentemente descritti, capitolo 3.1).

I risultati in figura 64 mostrano che sia Top1 wt sia Top1 Y727F sono presenti sulle ripetizioni telomeriche (pannello superiore) con un incremento di circa 2 volte nel recupero di DNA rispetto al livello soglia, mentre nelle regioni più distanti il legame dell'enzima non è individuabile. Anche altri loci genomici sono stati analizzati per il legame di Top1, come i siti NTS1 e NTS2 che appartengono a regioni regolatorie non trascritte dei geni per il DNA ribosomale; tali regioni sono state precedentemente individuate (Vogelauer 1999) come siti di legame e di taglio da parte di Top1. Sono state analizzate, inoltre, le regioni in 3' di alcuni geni trascritti che risultano up regolati da Top1. Nel pannello inferiore della figura 64, si può notare che i siti ribosomali risultano positivi per il legame di Top1 wt e Top1 Y727F, come precedentemente indicato; inoltre livelli di legame simili tra Top1 wt e Top1 Y727F sono osservabili su alcuni dei geni up regolati, senza, però, nessuna apparente correlazione con i valori di fold change.

Questi risultati derivano da due esperimenti di ChIP, in cui per ciascuna delle posizioni sono state fatte almeno due determinazioni con real-time PCR. I massimi valori di recupero del DNA, espressi in % dell'input, per Top1 Wt e Y727F sono stati arbitrariamente fissati ad 1.00, per cui quello osservato in figura 64 è un recupero di DNA relativo. La linea tratteggiata indica il recupero soglia in assenza di Top1 (Null, normalizzato sul massimo recupero di Top1 Wt).

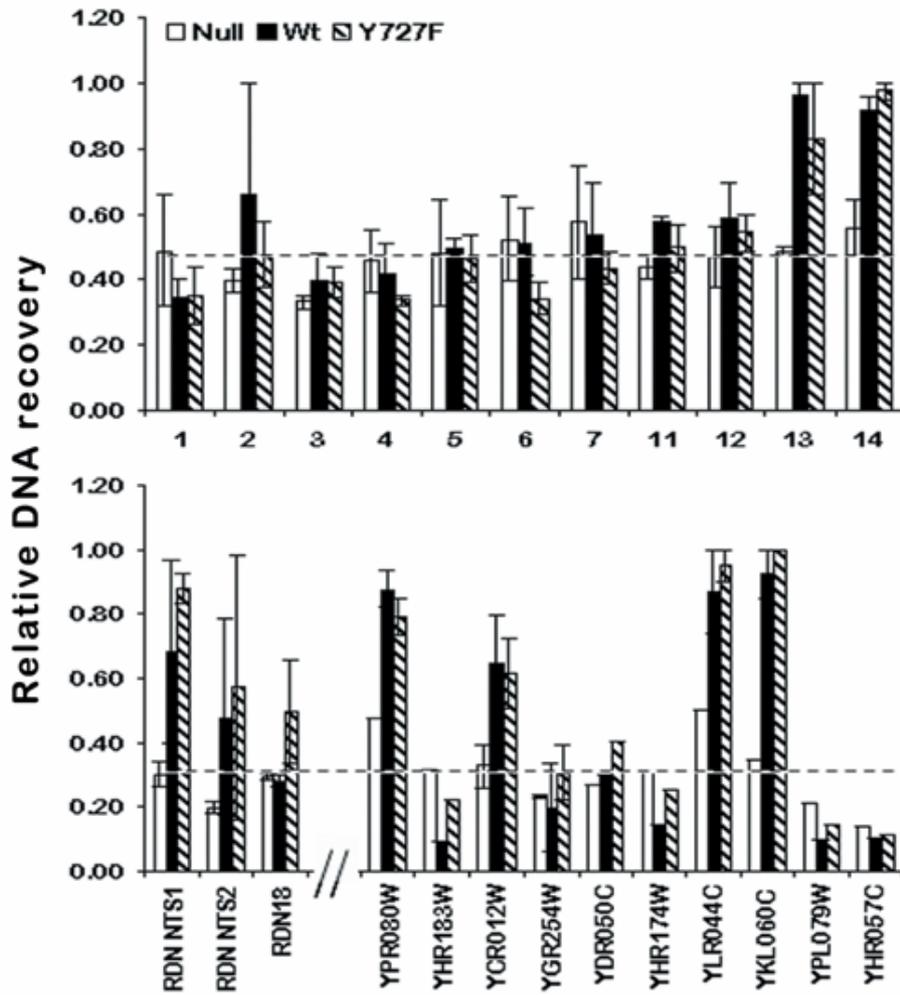


Figura 64. Recupero di Top1 nelle regioni telomeriche (pannello superiore) ed in altri loci genomici (pannello inferiore). Media di due esperimenti di ChIP, eseguiti con l'anticorpo anti-HA su cellule di JEL1Δtop1 con pCC10-HA (Wt, colonne nere), con pAR7-HA (Y727F, colonne barrate), con YCp50 (Null, colonne bianche).

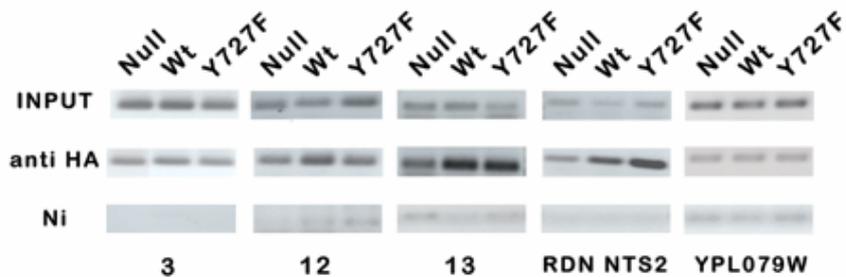


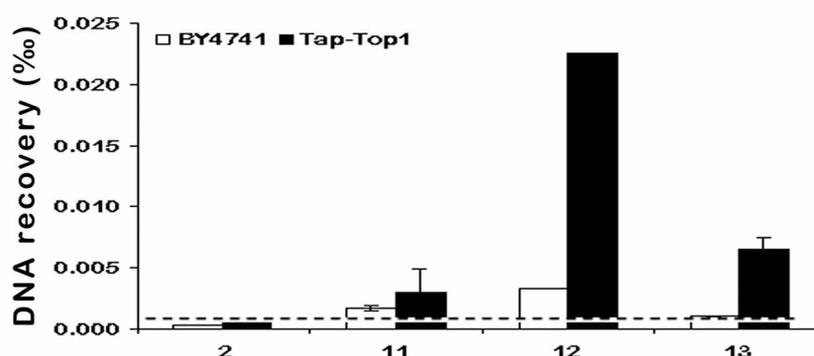
Figura 65. Corsa elettroforetica dei frammenti di DNA recuperato in diverse posizioni in un esperimento di ChIP rappresentativo.

In figura 65 è mostrata la corsa elettroforetica, dopo PCR quantitativa, sui frammenti di DNA recuperato in un esperimento di ChIP rappresentativo sui tre ceppi in diverse posizioni: con l'anticorpo anti-HA è visibile un aumento del recupero specifico di Top1 Wt e Y727F nelle regioni 12, 13 e RDN NTS2.

### 3.4.2. Top1 interagisce fisicamente con le regioni telomeriche e subtelomeriche in un diverso ceppo di lievito

Abbiamo esteso l'analisi dell'interazione fra Top1 e le regioni telomeriche ad un ceppo di lievito diverso da JEL1 $\Delta$ top1 in cui la Top1 è espressa da un plasmide; si tratta del ceppo YOL006C-TAP, che porta il gene endogeno YOL006C per Top1 fuso ad una Tandem Affinity Purification protein (TAP; 82) e del suo ceppo di controllo, BY4741, che non porta alcuna proteina TAP.

I risultati in figura 66 derivano dalla media di due (per alcune posizioni tre) determinazioni con real time PCR su una ChIP; essi indicano che TAP-Top1 è stata localizzata sulle ripetizioni del DNA telomeric, supportando i risultati già visti per Top1 codificata dal plasmide in cellule JEL1 $\Delta$ top1, in cui Top1 mostra un sito di legame preferenziale per le terminazioni cromosomiche.



**Figura 66.** DNA recuperato in ChIP tramite la Tandem Affinity Purification protein sul ceppo BY4741 (senza TAP, istogramma bianco) e sul ceppo YOL006C-TAP (con TAP-Top1, istogramma nero). La linea tratteggiata indica la media del recupero con BY4741, come livello soglia del recupero aspecifico.

### 3.4.3. Top1 localizzata sulle ripetizioni telomeriche è cataliticamente attiva

Poiché sia Top1 wt che la proteina inattiva legano le sequenze ripetute del DNA telomerico, ci siamo domandati se l'enzima sia cataliticamente attivo sul telomero.

Perciò, abbiamo determinato i livelli di DNA recuperato con precipitazione con  $K^+$ -SDS in seguito a trattamento con CPT per 5 minuti. Questa tecnica permette di determinare se e quanto DNA è intrappolato nell'intermedio di reazione con l'enzima tramite CPT, poiché l'enzima resta covalentemente legato al DNA (83).

Abbiamo misurato i livelli di recupero del DNA tramite PCR real time quantitativa; il grafico in figura 67 rappresenta la media di due esperimenti. Il recupero alla concentrazione di 0  $\mu$ M, ossia senza trattamento con il farmaco, è stato arbitrariamente fissato a 1.00 per ogni posizione analizzata, pertanto i recuperi a 10 e 100  $\mu$ M sono relativi al controllo per ciascuna posizione. Quindi i recuperi di ogni posizione (0, 10 e 100  $\mu$ M) sono stati normalizzati sul recupero della posizione 6.

I risultati indicano che le ripetizioni di DNA telomerico sono recuperate in modo dose-dipendente da CPT in cellule di lievito che esprimono solo Top1 wt (figura 67). Alcuni frammenti di controllo, come il sito regolatorio NTS2 del rDNA ed il gene YPR080W sono recuperati anch'essi in modo dose-dipendente nei precipitati con  $K^+$ -SDS in cellule che esprimono Top1 wt. Nelle cellule che esprimono Top1 Y727F, nessun frammento di DNA è stato recuperato, in quanto i valori di recupero sono tutti al di sotto del livello soglia, in maniera coerente con il fatto che l'enzima inattivo è resistente alla CPT (figura 67, pannello inferiore).

Questi risultati dimostrano che Top1 localizza *in vivo* ed è cataliticamente attiva nelle ripetizioni telomeriche in lievito. In ogni caso, poiché si tratta appunto di regioni ripetute (core X, repeater T e TG<sub>1-3</sub>), esse sono presenti nei telomeri di tutti i cromosomi di *S. cerevisiae*, rendendo difficile discriminare se Top1 si localizzi o no soltanto su un determinato gruppo di telomeri in lievito.

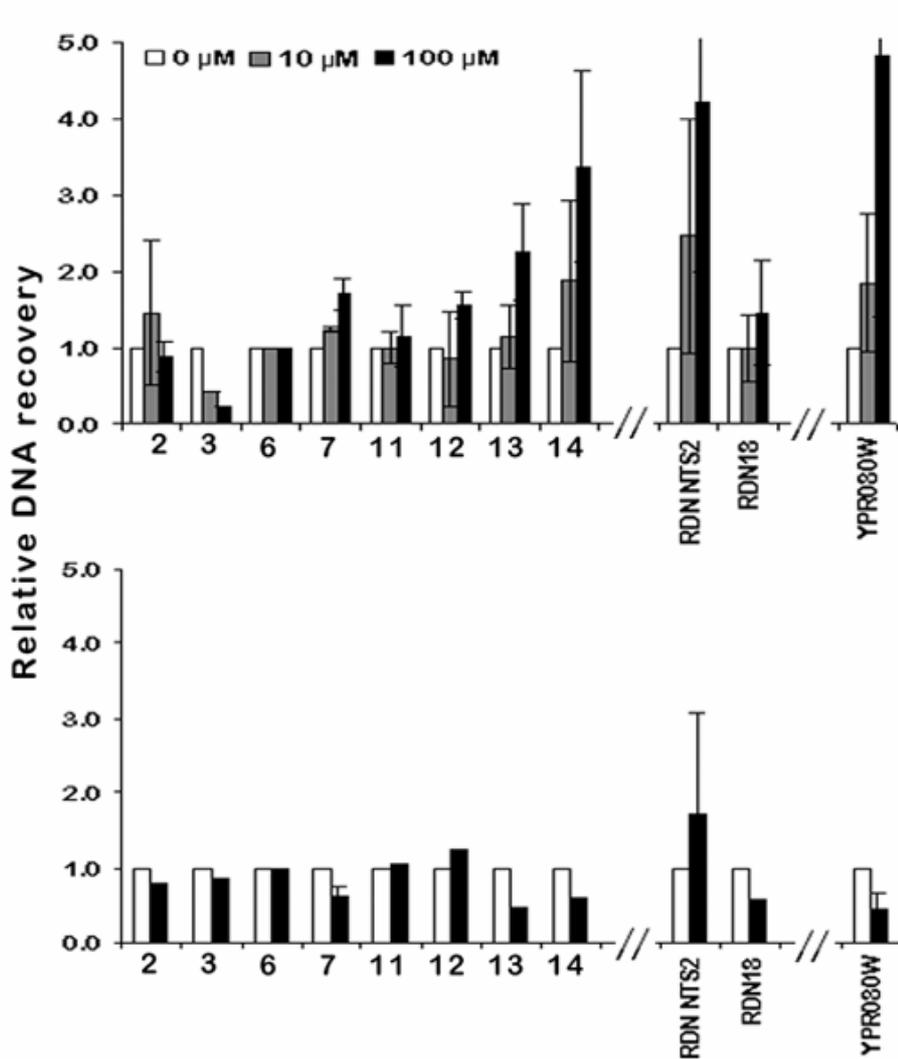


Figura 67. Recupero relativo di DNA con precipitazione con  $K^+$ -SDS in seguito a trattamento degli sferoplasti di lievito con CTP per 2 minuti. Nel pannello superiore è riportato l'esperimento sul ceppo JEL1Δtop1 con pCC10-HA (Wt), nel pannello inferiore sul ceppo JEL1Δtop1 con pAR7-HA (Y727F).

### **3.5. Top1 influenza le modificazioni istoniche ed il reclutamento di Sir3 nel telomero destro del cromosoma XIV in cellule di *S. cerevisiae* in fase esponenziale di crescita**

Dato che Top1 si localizza sui telomeri in lievito ed è cataliticamente attiva, abbiamo indagato se la sua attività avesse o no un effetto *in cis* Sir-dipendente sul silencing telomerico, con possibili conseguenze sull'espressione genica nel telomero studiato. Perciò abbiamo valutato se Top1 alteri le modificazioni istoniche ed il reclutamento di Sir3 nel telomero destro del cromosoma XIV in cellule di JEL1 $\Delta$ top1 tramite ChIP.

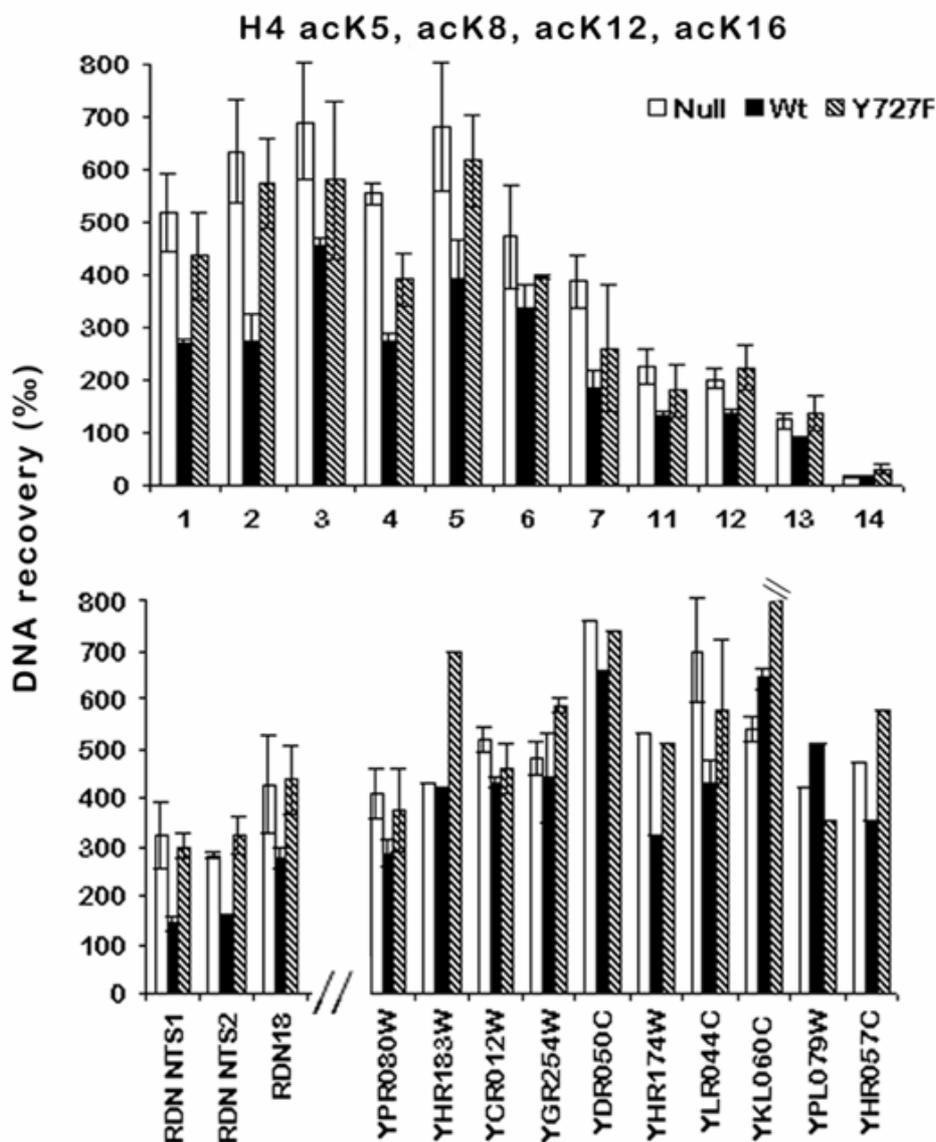
#### **3.5.1. Top1 wt altera l'acetilazione dell'istone H4 nelle regioni telomeriche**

Abbiamo valutato l'influenza di Top1 sui livelli di acetilazione delle lisine 5, 8, 12 e 16 dell'istone H4 tramite ChIP con l'anticorpo anti acetil-istone H4 (06-866 Upstate) in cellule di JEL1 $\Delta$ top1 con pCC10 (Wt), pAR7 (Y727F) e YCp50 (Null), analizzando alcune regioni telomeriche e subtelomeriche del braccio destro del cromosoma XIV (figura 68, pannello superiore) ed altre regioni di controllo, quali i siti NTS1 e NTS2, regolatori dei geni per il DNA ribosomale ed altre regioni in 3' di alcuni geni trascritti che risultano up regolati da Top1 (figura 68, pannello inferiore).

I risultati, derivati dalla media di due esperimenti, indicano che la tetra-acetilazione dell'istone H4 è sensibilmente ridotta da Top1 wt in quasi tutte le posizioni telomeriche analizzate, rispetto all'enzima Top1 inattivo e all'assenza dell'enzima stesso. Una riduzione della tetra-acetilazione di H4 è stata osservata anche ai siti regolatori del rDNA NTS1 e NTS2, in accordo con i dati pubblicati sugli effetti di Top1 sulle lisine 12 e 16 in queste regioni (54).

E' molto interessante notare che i livelli di tetra-acetilazione di H4 sono molto simili negli altri loci genomici osservati confrontando cellule che esprimono Top1 wt,

mutata o in assenza di enzima, indicando che l'effetto di Top1 wt sull'acetilazione dell'istone è specifico delle regioni subtelomeriche e dei siti ribosomali.



**Figura 68.** Ruolo di Top1 nella regolazione dell'acetilazione dell'istone H4 in regioni telomeriche. Negli esperimenti di ChIP è stato usato l'anticorpo anti acetil-Lys 5, 8, 12 e 16 dell'istone H4 su cellule di JEL1Δtop1 con pCC10 (Wt, colonne nere), con pAR7 (Y727F, colonne barrate) e con YCp50 (Null, colonne bianche).

### **3.5.2. Top1 wt altera l'acetilazione della lisina 16 dell'istone H4 nelle regioni telomeriche**

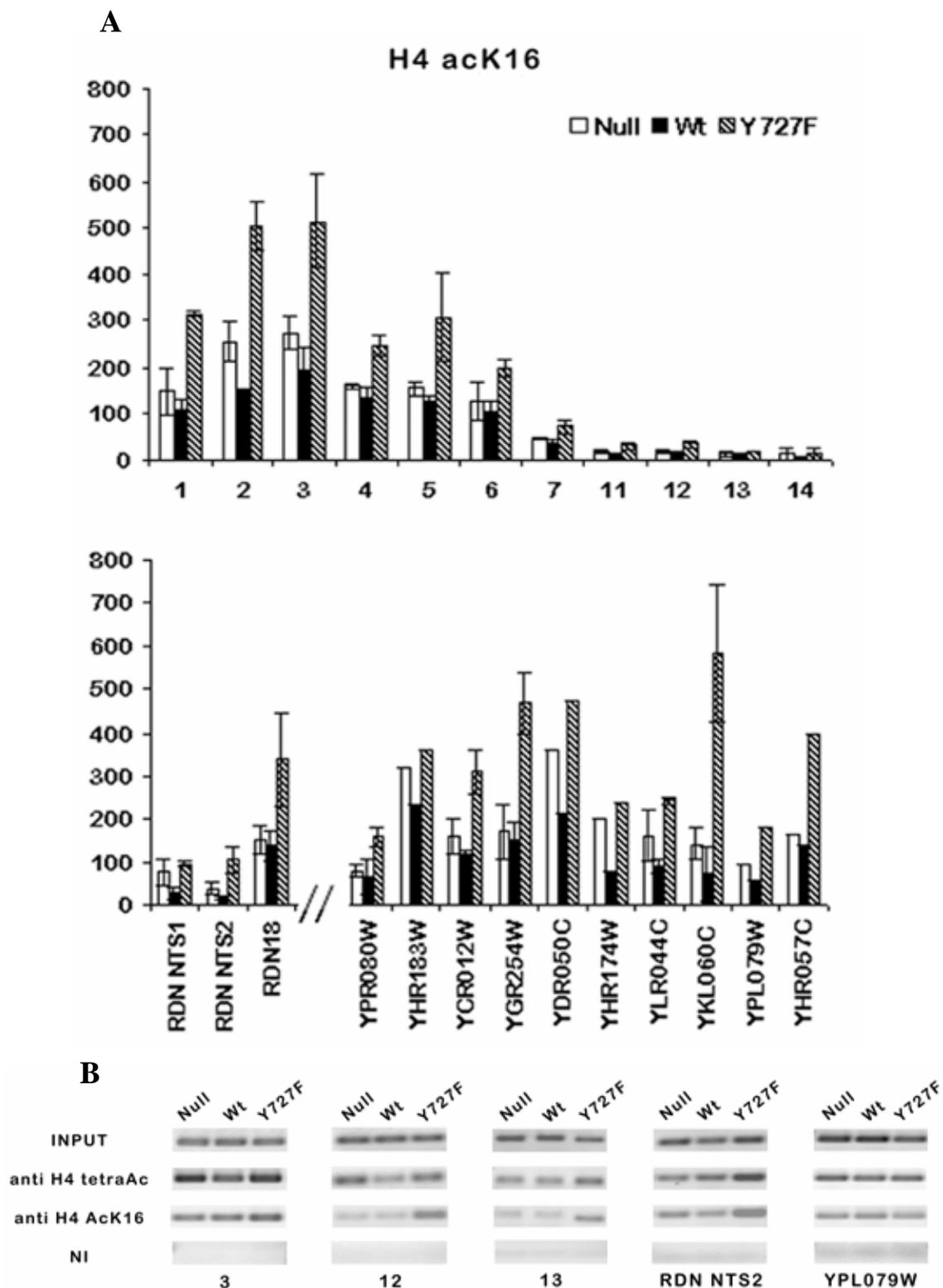
Successivamente abbiamo esaminato i livelli di acetilazione della lisina 16 sull'istone H4, poiché essa rappresenta il residuo bersaglio della proteina Sir2, che ne rimuove il gruppo acetile permettendo la propagazione della cromatina silenziata alle regioni adiacenti alle ripetizioni telomeriche (75).

Gli esperimenti di ChIP sono stati condotti con l'anticorpo anti acetil-istone H4 Lys 16 (06-762 Upstate) in cellule di JEL1 $\Delta$ top1 con pCC10 (Wt), pAR7 (Y727F) e YCp50 (Null), analizzando le regioni telomeriche e subtelomeriche del braccio destro del cromosoma XIV (figura 69A, pannello superiore) ed altre regioni di controllo, quali i siti NTS1 e NTS2, regolatori dei geni per il DNA ribosomale ed altre regioni in 3' di alcuni geni trascritti che risultano up regolati da Top1 (figura 69A, pannello inferiore).

I risultati, derivati dalla media di tre esperimenti, indicano che l'acetilazione della lisina 16 sull'istone H4 è ridotta da Top1 wt mentre è aumentata dall'enzima inattivo Y727F rispetto all'assenza dell'enzima, indicando che l'attività enzimatica influenza sensibilmente l'acetilazione delle lisina 16 su H4: il mutante di Top1, infatti, aumenta di 2-3 volte i livelli di acetilazione nella regione subtelomerica del cromosoma XIV. Sebbene Top1 inattiva incrementi l'acetilazione di K16 su H4 in molti altri loci genomici, l'aumento nelle posizioni NTS1 e NTS2 è più alto e simile a quello delle regioni subtelomeriche.

Questi effetti di Top1 Y727F indicano che l'enzima inattivo potrebbe interferire con l'attività deacetilasica di Sir2 e quindi con il meccanismo del silencing più in generale.

In figura 69B è mostrata la corsa elettroforetica, dopo PCR quantitativa, sui frammenti di DNA recuperato in un esperimento di ChIP rappresentativo sui tre ceppi in diverse posizioni: con l'anticorpo anti-acetil H4 è visibile una riduzione del recupero specifico per Top1 Wt nelle regioni 3 e 12; con l'anticorpo anti-acetil H4 Lys 16 un aumento del recupero specifico per Y727F nelle regioni 3, 1, 13 e NTS2.



**Figura 69. Ruolo di Top1 nella regolazione dell'acetilazione della lisina 16 sull'istone H4 in regioni telomeriche.** Negli esperimenti di ChIP è stato usato l'anticorpo anti acetil-istone H4 Lys 16 su cellule di JEL1 $\Delta$ top1 con pCC10 (Wt, colonne nere), con pAR7 (Y727F, colonne barrate) e con YCp50 (Null, colonne bianche). **B.** Corsa elettroforetica dei frammenti di DNA recuperato in diverse posizioni in un esperimento di ChIP rappresentativo.

### **3.5.3. Controllo dei livelli totali di istone H4 legato al telomero destro del cromosoma XIV**

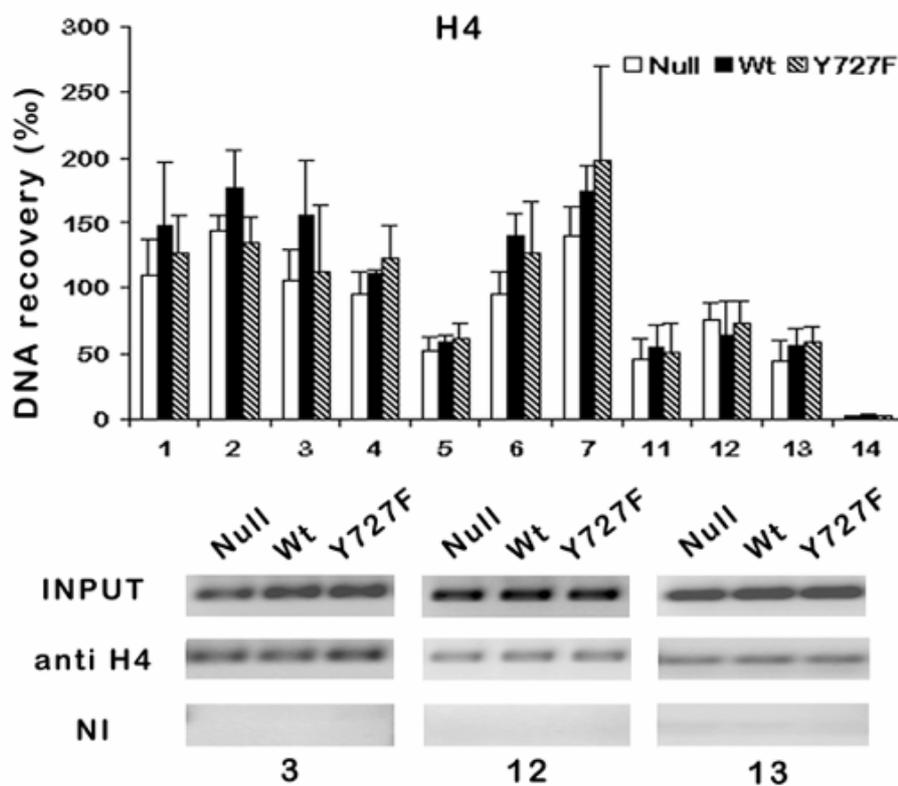
In seguito a questi risultati, che indicano un diverso grado di acetilazioni istoniche in ceppi con o senza una Top1 funzionale, abbiamo verificato quali fossero i livelli dell'istone H4 non modificato associato alla cromatina delle regioni analizzate, allo scopo di confermare che le differenze nell'acetilazione osservate precedentemente non siano dovute ad un'alterata densità dell'istone H4 lungo in telomero studiato nei tre ceppi di lievito.

Gli esperimenti di ChIP sono stati condotti con l'anticorpo anti istone H4 (ab10158 Abcam) in cellule di JEL1 $\Delta$ top1 con pCC10 (Wt), pAR7 (Y727F) e YCp50 (Null), analizzando le regioni telomeriche e subtelomeriche del braccio destro del cromosoma XIV (figura 70).

I risultati, derivati dalla media di tre esperimenti, indicano che i livelli dell'istone H4 legato alle regioni analizzate sono simili fra le cellule di lievito con Top1 wt, Y727F e in assenza di Top1.

E' interessante notare che la densità dell'istone H4 è 2-3 volte minore (e quindi l'acetilazione è proporzionalmente più alta) nella regione promotrice del gene YNR074C (amplicone 5), che è noto essere espresso a livelli significativi (77) e non risulta alterato da Top1 nel nostro studio.

Nella parte inferiore della figura 70, è mostrata la corsa elettroforetica, dopo PCR quantitativa, sui frammenti di DNA recuperato in un esperimento di ChIP rappresentativo sui tre ceppi in diverse posizioni: con l'anticorpo anti istone H4 è visibile che il recupero specifico per Top1 Wt, Y727F e Null nelle regioni 3, 12 e 13 è simile.



**Figura 70.** Controllo della densità dell'istone H4 nelle regioni telomeriche. Negli esperimenti di ChIP è stato usato l'anticorpo anti istone H4 su cellule di JEL1 $\Delta$ top1 con pCC10 (Wt, colonne nere), con pAR7 (Y727F, colonne barrate) e con YCp50 (Null, colonne bianche). Nel pannello inferiore: corsa elettroforetica dei frammenti di DNA recuperato nelle posizioni 3, 12 e 13 in un esperimento di ChIP rappresentativo.

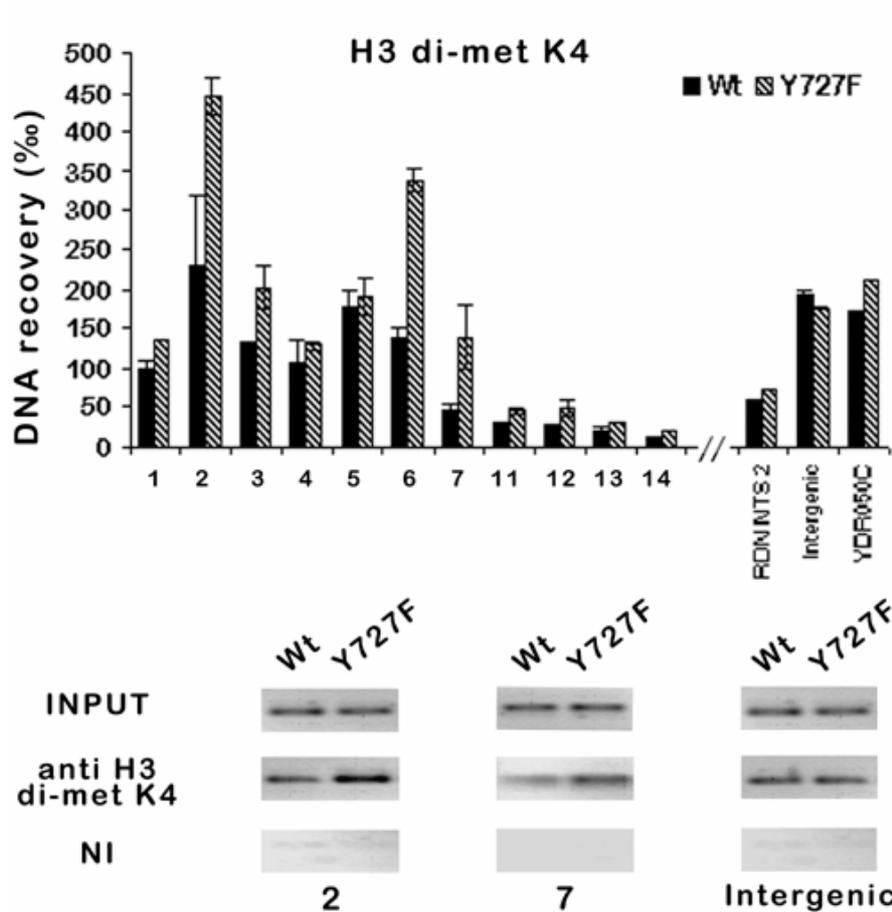
### **3.5.4. Top1 wt altera la metilazione della lisina 4 dell'istone H3 nelle regioni telomeriche**

In seguito ai risultati ottenuti sull'influenza di Top1 sull'acetilazione di H4, abbiamo esteso l'analisi ad altre modificazioni, come la di-metilazione della lisina 4 su H3, che è noto essere coinvolta nel prevenire il legame del complesso Sir alla cromatina.

Gli esperimenti di ChIP sono stati condotti con l'anticorpo anti dimetil-istone H3 K4 (07-030 Upstate) in cellule di JEL1 $\Delta$ top1 con pCC10 (Wt) e pAR7 (Y727F) analizzando le regioni telomeriche e subtelomeriche del braccio destro del cromosoma XIV e tre regioni di controllo, quali il sito NTS2, una regione intergenica e la regione in 3' di YDR050C, un gene molto trascritto che risulta up regolato da Top1. (figura 71).

I risultati, derivati dalla media di due esperimenti, indicano che la dimetilazione della lisina 4 non cambia nelle tre regioni di controllo, ma è sensibilmente diversa nelle regioni subtelomeriche tra cellule con Top1 wt o inattiva. Top1 Y727F aumenta, infatti, i livelli della modificazione su H3 in alcune regioni analizzate, in particolare la dimetilazione della lisina 4 è aumentata al 3' e alla fine del gene YNR076W, che è il più vicino alle ripetizioni telomeriche. E' interessante notare che non si osservano effetti nella regione regolatoria per l'rDNA, NTS2; questo suggerisce la specificità per il telomero delle modificazioni osservate.

Nella parte inferiore della figura 71, è mostrata la corsa elettroforetica, dopo PCR quantitativa, sui frammenti di DNA recuperato in un esperimento di ChIP rappresentativo sui tre ceppi in diverse posizioni: con l'anticorpo anti dimetil-istone H3 Lys4 è visibile un aumento del recupero specifico per Top1 Y727F nelle regioni 2 e 7.



**Figura 71. Ruolo di Top1 nella regolazione della dimetilazione della lisina 4 sull'istone H3 in regioni telomeriche. Negli esperimenti di ChIP è stato usato l'anticorpo anti dimetil-istone H3 Lys 4 su cellule di JEL1 $\Delta$ top1 con pCC10 (Wt, colonne nere) e con pAR7 (Y727F, colonne barrate). Nel pannello inferiore: corsa elettroforetica dei frammenti di DNA recuperato nelle posizioni 2, 7 ed intergenica in un esperimento di ChIP rappresentativo.**

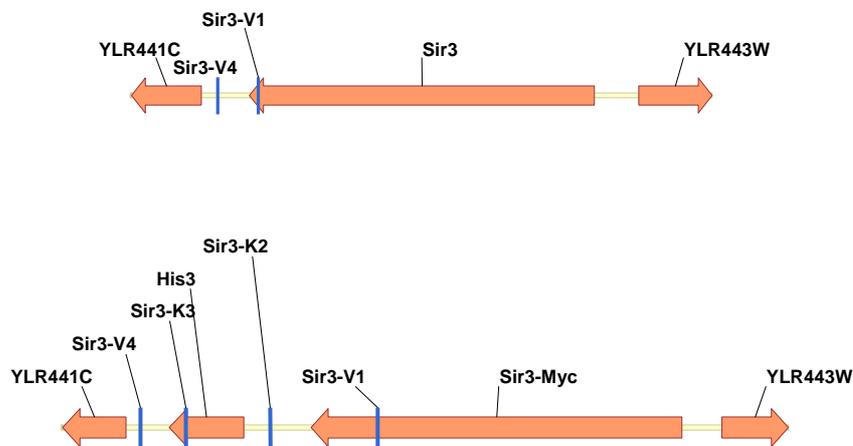
### **3.5.5. Top1 altera la distribuzione della proteina Sir3 nella regione subtelomerica studiata.**

Per analizzare se Top1 alteri la propagazione del complesso SIR lungo le regioni subtelomeriche, abbiamo misurato i livelli della proteina Sir3 legata alla cromatina, dopo aver costruito un ceppo di lievito derivato da JEL1 $\Delta$ top1 che porta un tag per Myc nel C terminale della CDS di Sir3 endogena (figura 72).

Nel ceppo ALE1 abbiamo realizzato l'inserimento in frame di una cassetta 13xMYC-His3, amplificata dal plasmide pFA6A-13Myc-His3MX6 (fig. 25 in materiali e metodi; gentilmente fornito da Mark Longtine, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO; 84), nel C terminale della sequenza codificante del gene YLR442C (Sir3) per ottenere una proteina Sir3 fusa all'epitopo 13Myc.

La cassetta 13Myc-His3 è stata amplificata con il termociclo SIR, con i primer Sir3 fw- Sir3 rv, in cui la porzione sottolineata si appaia al plasmide nelle posizioni indicate, la porzione non sottolineata protrude in 5' del primer ed è omologa alla regione genomica del cromosoma XII, rispettivamente 50 bp a valle e a monte del codone di terminazione della traduzione del gene YLR442C. In seguito al processo di ricombinazione omologa, i cloni positivi sono stati selezionati su terreno selettivo his-, successivamente il loro genoma è stato analizzato per la presenza dell'inserito con PCR (termociclo screening) con i primer, indicati in figura 72: Sir3 V1 e Sir3 V4 si appaiano nella regione genomica non modificata rispettivamente a valle e a monte dello stop codon di YLR442C, Sir3-K2 e Sir3-K3 si appaiano all'interno del frammento clonato. Delle 32 colonie positive alla selezione su terreno his-, 10 sono state analizzate tramite PCR secondo lo schema della tabella 6 e 2 sono risultate positive per l'inserimento del frammento: in figura 73 è riportata la corsa elettroforetica dei prodotti di PCR sul clone 1.

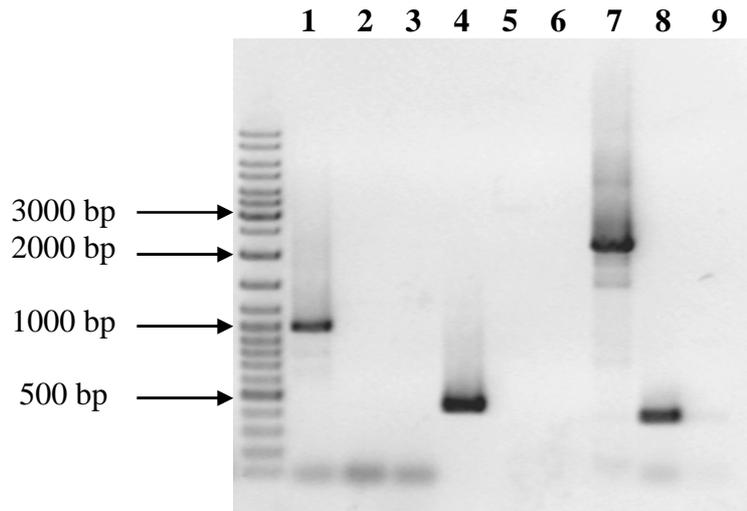
Abbiamo poi verificato che la proteina fusa al tag fosse correttamente espressa, immunoprecipitata e riconosciuta dall'anticorpo anti-Myc tag, clone 9E10 in western blotting. Dalla figura 74 è evidente che la proteina SIR3-Myc espressa nel ceppo ALE1 presenta il peso molecolare atteso, è riconosciuta specificamente e si immunoprecipita tramite il tag clonato con l'anticorpo anti-Myc tag.



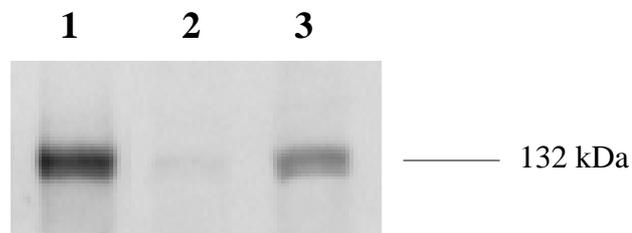
**Figura 72.** Mappa della sequenza codificante per Sir3 nel ceppo JEL1Δtop1 (pannello superiore) e nel ceppo ALE1 (pannello inferiore): in quest'ultimo si può notare la presenza dell'epitopo 13xMyc clonato nella porzione C terminale della CDS e del marcatore di selezione His3. I primer Sir3 V1 e Sir3 V4 si appaiano rispettivamente a valle e a monte dello stop codon di YLR442C in entrambi i ceppi, producendo frammenti di PCR di dimensioni diverse; i primer Sir3-K2 e Sir3-K3 si appaiano solo all'interno del frammento clonato, pertanto solo nel ceppo ALE1.

Coppia di primer/ceppo	ALE1	JEL1Δtop1	H <sub>2</sub> O
V1 fw- K2 rv	1023 bp	---	---
K3 fw- V4 rv	442 bp	---	---
V1 fw- V4 rv	2244 bp	366 bp	---

**Tabella 6.** Schema delle coppie di primer e dei pesi dei prodotti di PCR attesi per i diversi ceppi nello screening dei ricombinanti.



**Figura 73.** Corsa elettroforetica dei prodotti di PCR per lo screening del clone 1 positivo alla ricombinazione omologa con il tag 13xMyc in C terminale della CDS di YLR442C con la coppia di primer V1 fw- K2 rv su ALE1, JEL1 $\Delta$ top1 e H<sub>2</sub>O (rispettivamente pozzetti 1,, 2 e 3), con la coppia di primer K3 fw- V4 rv su ALE1, JEL1 $\Delta$ top1 e H<sub>2</sub>O (rispettivamente pozzetti 4,, 5 e 6). con la coppia di primer V1 fw- V4 rv su ALE1, JEL1 $\Delta$ top1 e H<sub>2</sub>O (rispettivamente pozzetti 7,, 8 e 9).

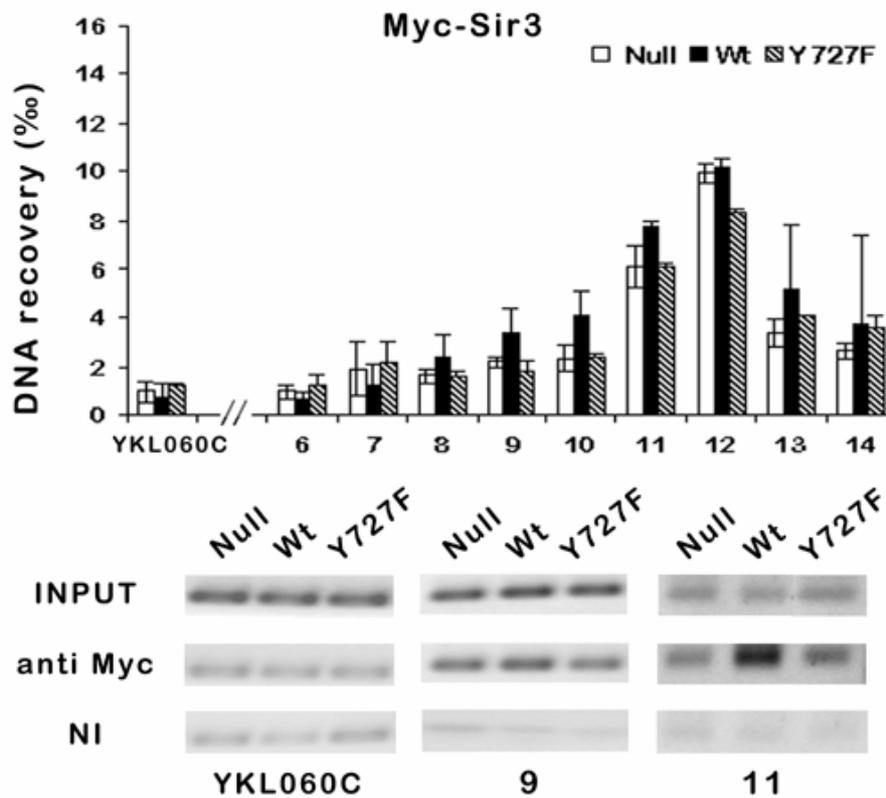


**Figura 74.** Western blotting sull'estratto proteico totale dal ceppo ALE1 (pozzetto 3), sull'immunoprecipitato dell'estratto proteico (1) e sul supernatante dell'immunoprecipitazione (2) nel ceppo ALE1. L'anticorpo usato per immunoprecipitare la proteina e per rivelare il western blotting è anti-Myc tag, clone 9E10.

Dopo aver verificato che la proteina di fusione Myc-Sir3 sia correttamente espressa e immunoprecipitata dall'anticorpo specifico per il tag, abbiamo misurato i livelli di Sir3 legata alla cromatina tramite ChIP.

Gli esperimenti sono stati condotti con l'anticorpo anti-Myc Tag, clone 9E10 (05-419 Upstate) in cellule di ALE1 con pCC10 (Wt), pAR7 (Y727F) e YCp50 (Null), analizzando le regioni telomeriche e subtelomeriche del braccio destro del cromosoma XIV ed in una regione di controllo, nel 3' di YKL060C, un gene molto trascritto che risulta up regolato da Top1. (figura 75).

I risultati, derivati dalla media di tre esperimenti, indicano che Top1 wt aumenta il reclutamento di Sir3 da 1.5 a 2.0 volte nelle regioni di confine delle ripetizioni telomeriche, vicino alla regione in cui sono stati osservati minori livelli di dimetilazione della lisina 4 su H3 e di acetilazione della lisina 16 su H4. La top1 Y727F non ha effetti sul reclutamento di Sir3 relativamente all'assenza dell'enzima.



**Figura 75. Ruolo di Top1 nella distribuzione di Sir3 nelle regioni telomeriche.** Negli esperimenti di ChIP è stato usato l'anticorpo anti-Myc Tag su cellule di ALE1 con pCC10 (Wt, colonne nere), con pAR7 (Y727F, colonne barrate) e con YCp50 (Null, colonne bianche). Nel pannello inferiore: corsa elettroforetica dei frammenti di DNA recuperato nelle posizioni YKL060C, 9 e 11 in un esperimento di ChIP rappresentativo.

### **3.6. Costruzione e caratterizzazione di un ceppo di lievito con un gene reporter inserito nel telomero XIV - braccio destro.**

I risultati precedentemente descritti individuano un ruolo forte per Top1 nella regolazione dell'espressione dei geni telomerici, che si esprime attraverso le modificazioni della struttura della cromatina e la distribuzione dei complessi Sir e che avviene attraverso un'interazione diretta di Top1 sulle ripetizioni telomeriche stesse.

A questo punto, ci siamo domandati quale sia l'effetto della proteina sull'espressione di un gene reporter clonato nella regione telomerica di interesse e abbiamo costruito un ceppo, derivato da JEL1 $\Delta$ top1, che porta un marcatore di selezione per l'auxotrofia nel braccio destro del cromosoma XIV per valutare il coinvolgimento dell'enzima nella regolazione sia dell'espressione del gene sia della struttura della cromatina.

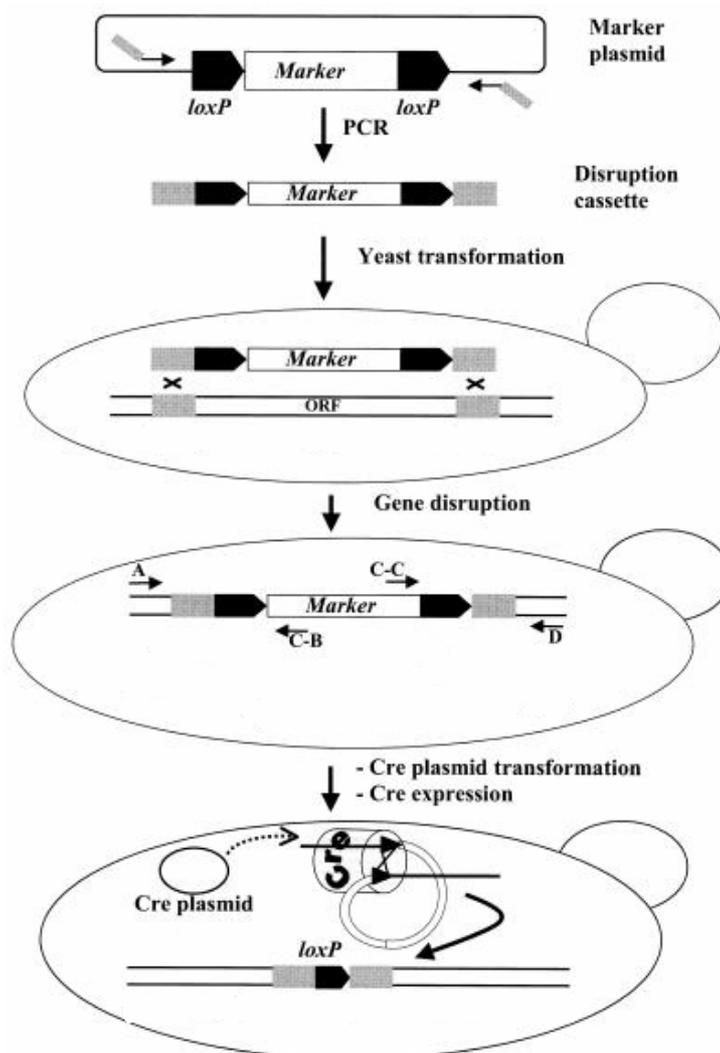
Alcuni lavori (85; 86) indicano, inoltre, una strategia per esaminare la topologia del DNA cromosomale a livello dei loci HM silenziati che consta nell'inserimento di due siti per una ricombinasi che affiancano la regione d'interesse: la ricombinazione tra questi due siti porta alla formazione ed excisione di un micro-circolo che, dopo deproteinizzazione, può essere analizzato nella sua topologia.

Perciò, tramite ricombinazione omologa, abbiamo clonato nella porzione genica da 2 a 4 kb dal telomero indicato una cassetta LoxP-His5-LoxP (figura 76), formata da due sequenze LoxP che fiancheggiano il gene HIS5 di *Schizosaccharomyces pombe* che è in grado di complementare la funzione di HIS3 di *Saccharomyces cerevisiae*: entrambi i geni codificano per l'enzima deidratasi imidazolo glicerolo fosfato. I loci P sono 2 sequenze di 34 bp ripetute, nello stesso orientamento, bersagli di un sistema di ricombinazione del fago T4, riconosciute dalla ricombinasi Cre che contatta contemporaneamente i due loci, ravvicinati dall'interazione con l'enzima, e permette la ricombinazione tra essi con la formazione di un microcircolo di DNA contenente il DNA fiancheggiato dalle sequenze stesse (87).

Il marcatore di selezione per HIS5 è stato clonato effettuando una sostituzione della porzione genomica telomerica, piuttosto che un'inserzione che avrebbe alterato la lunghezza del telomero studiato e la distanza delle ORF in esso contenute dalla

terminazione stessa. La regione da deletare è stata scelta tenendo conto sia della posizione rispetto al telomero (dista infatti 2 kb da esso), sia della funzione delle ORF deletate e sostituite, in essa contenute: YNR075w e YNR076w.

La delezione di YNR075w e YNR076w è stata motivata, dunque, dalla vitalità dei mutanti, dalla posizione delle ORF rispetto al telomero, dalla dimensione della ORF



**Figura 76. Sistema LoXP/Cre gene destruction.** La cassetta consiste di un marcatore di selezione fiancheggiato da due sequenze LoXP di 34 bp ed adiacenti a circa 50 bp di sequenza omologa alla sequenza target cromosomica da deletare. La cassetta di delezione è costruita tramite PCR usando dei primer omologhi al plasmide che porta il marcatore e che portano in 5' una sequenza omologa ai siti a monte e a valle della sequenza target genomica. Dopo la trasformazione, la cassetta entra in cellule di lievito, i trasformanti sono selezionati ed analizzati tramite PCR per la corretta integrazione. In fine, l'espressione della ricombinasi Cre provoca la rimozione del marcatore, lasciando un solo sito LoXP nel locus cromosomico. Figura modificata da Gueldener, 2002.

rispetto alla cassetta sostituyente e dal fatto che, poiché si tratta di proteine appartenenti a famiglie con funzione non chiaramente definita, è più probabile che la loro delezione fosse complementata funzionalmente da altri membri della stessa famiglia.

YNR075w è una ORF verificata che codifica per una proteina, classificata nella famiglia delle DUP380, con funzione non conosciuta. La delezione di questo gene non comporta la morte cellulare, anzi si osserva che la curva di crescita del ceppo col gene deletato va a coincidere con quella del ceppo wild type.

YNR076w è anch'essa una ORF verificata che codifica per una proteina che fa parte della famiglia multigenica della seuripauperina; questa famiglia contiene 23 membri codificati in regioni subtelomeriche, attivi durante la fermentazione alcolica, regolati dall'anaerobiosi e repressi in presenza dell'eme.

In figura 77 è riportata la mappa delle 15 kbp terminali del braccio destro del cromosoma XIV: sono indicate tutte le CDS presenti e, nel pannello A in giallo la regione che sarà delegata in JEL1 $\Delta$ top1, nel pannello B in verde il frammento clonato. Per amplificare della cassetta LoxP-His5-LoxP, (termociclo L-H-L), è stato utilizzato come stampo il plasmide pUG27, (figura 26 in materiali e metodi), precedentemente linerizzato. La mappa riporta le posizioni dei primer evidenziati in verde, uno interno (YNR076 fw e H2 fw, rispettivamente per il ceppo JEL1 $\Delta$ top1 e per il suo derivato) e due esterni (76Arv e 76B rv) alla regione di ricombinazione.

Il prodotto atteso è di 2483 bp, utilizzando due primer che presentano una porzione omologa al plasmide pUG2 che permette l'amplificazione della cassetta LoxP-HIS5-LoxP ed in 5' una porzione di 50 bp protudente ed omologa alla regione genomica a monte ed a valle della regione da deletare.

Il ceppo Jel1 $\Delta$ Top1 è stato trasformato con 3,8  $\mu$ g di DNA della cassetta LoxP-HIS5-LoxP: i lieviti positivi per la ricombinazione omologa sono stati selezionati su terreno selettivo per istidina. Delle colonie cresciute su terreno his-, 3 sono state isolate ed analizzate tramite PCR colony, (termociclo screening, T° di annealing 50°C), per poterne valutare il genotipo in seguito alla ricombinazione. Le coppie di primer sono state utilizzate secondo la tabella 7.

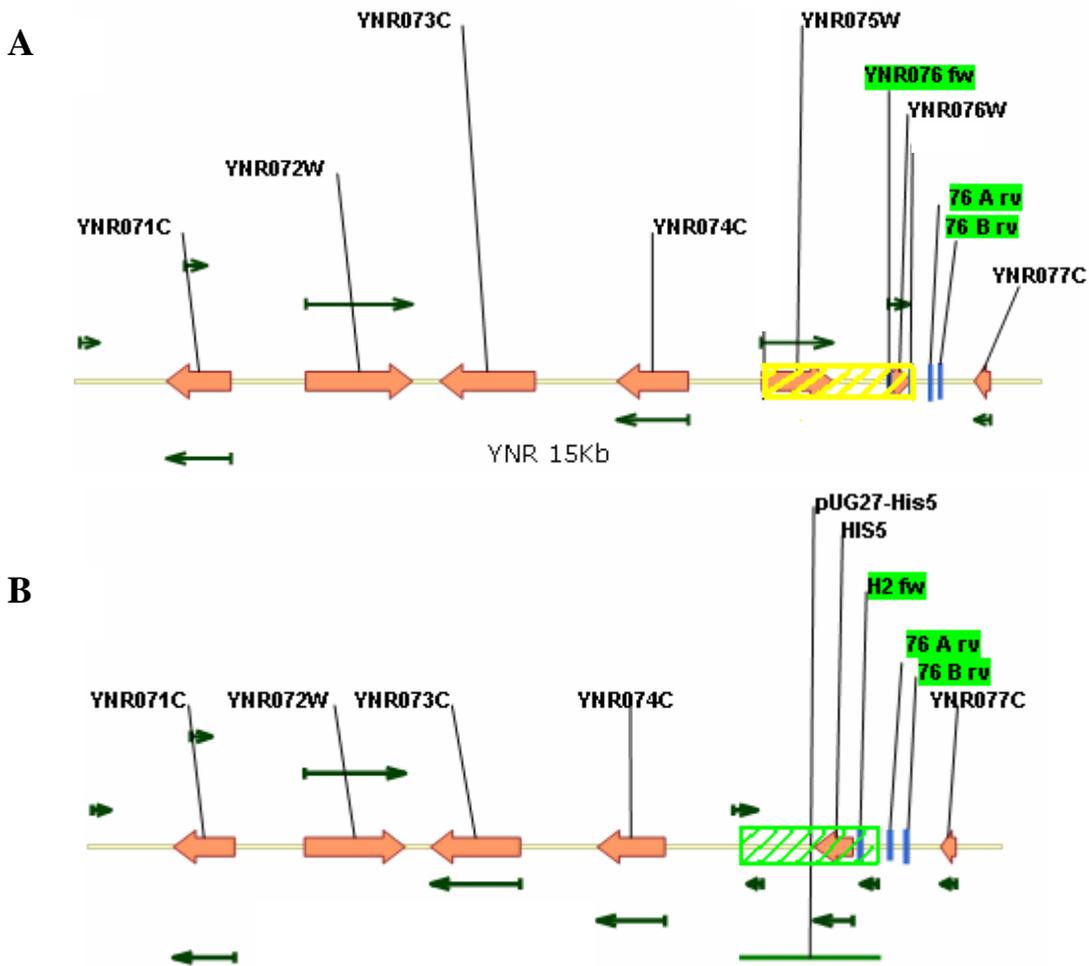
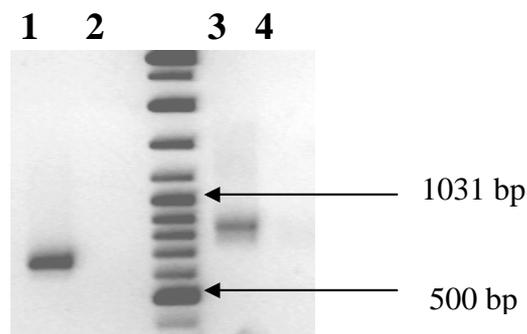


Figura 77. Mappa del telomero XIVR. In arancio sono riportate le CDS, con le frecce verdi sono indicate tutte le ORF maggiori di 50 bp. Nel pannello A, il rettangolo in giallo evidenzia la regione che sarà deletata; sono indicate le posizioni dei primer (in verde) utilizzati per lo screening dei ricombinanti, uno interno (YNR076 fw) e due esterni alla regione deletata. Nel pannello B, il rettangolo in verde evidenzia la cassetta inserita attraverso ricombinazione omologa; sono indicate le posizioni dei primer(in verde), uno interno (H2 fw) e due esterni alla regione clonata.

Coppia di primer/ceppo	EM1	JEL1 $\Delta$ top1
H2fw-76Arv	665 bp	---
YNR076fw-76Brv	---	835 bp

Tabella 7. Schema delle coppie di primer e dei pesi dei prodotti di PCR attesi per i diversi ceppi nello screening dei ricombinanti.

La figura 78 mostra la corsa elettroforetica del prodotto di PCR colony sul clone 1 con le coppie di primer H2fw-76Brv e YNR076fw-76Arv sul ceppo EM1 e JEL1 $\Delta$ top1. Nel pozzetto 1 si osserva l'amplificato su una colonia ricombinante con la coppia H2fw-76Brv: il peso ottenuto è 665bp; nel pozzetto 4 è mostrata l'assenza di amplificato sulla stessa colonia ricombinante con la coppia YNR076fw-76Brv. Questi risultati indicano l'effettivo inserimento del frammento Loxp-His5-LoxP. Le PCR sulla colonia wild type amplificano solo con la coppia YNR076fw-76Brv (pozzetto 3) e non con la coppia H2fw-76Brv (pozzetto 2).



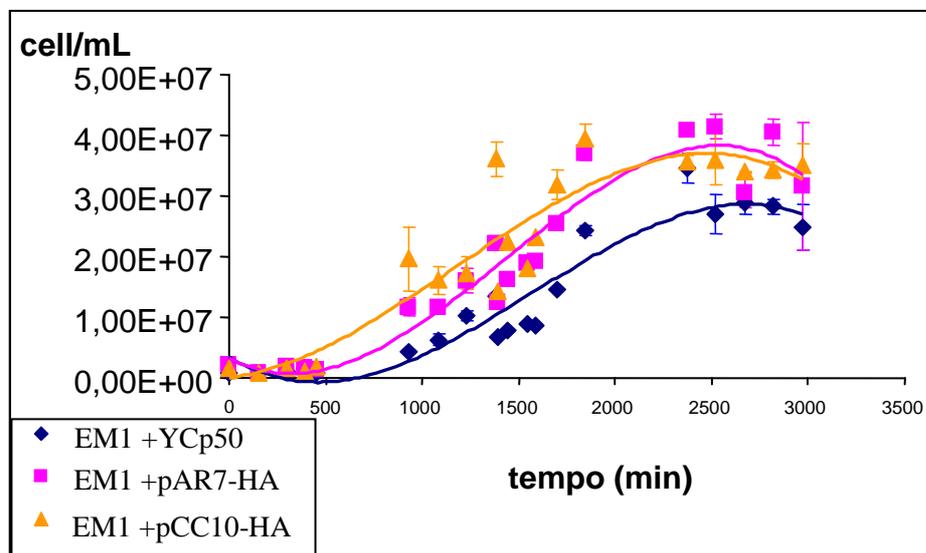
**Figura 78. Corsa elettroforetica dei prodotti della PCR colony sul ceppo EM1 (1-2) e JEL1 $\Delta$ top1 (3-4) con le coppie di primer H2fw-76Brv (1 e 4) e YNR076fw-76Arv (2 e 3).**

Nella fase di caratterizzazione del ceppo trasformato si è osservato che le colonie cresciute su terreno privo di istidina sono di più piccole dimensioni rispetto a quelle cresciute in terreno completo. Questo dato è concordante con il fatto che il gene HIS3 o HIS5, in regioni telomeriche è espresso a livelli basali di trascrizione (87).

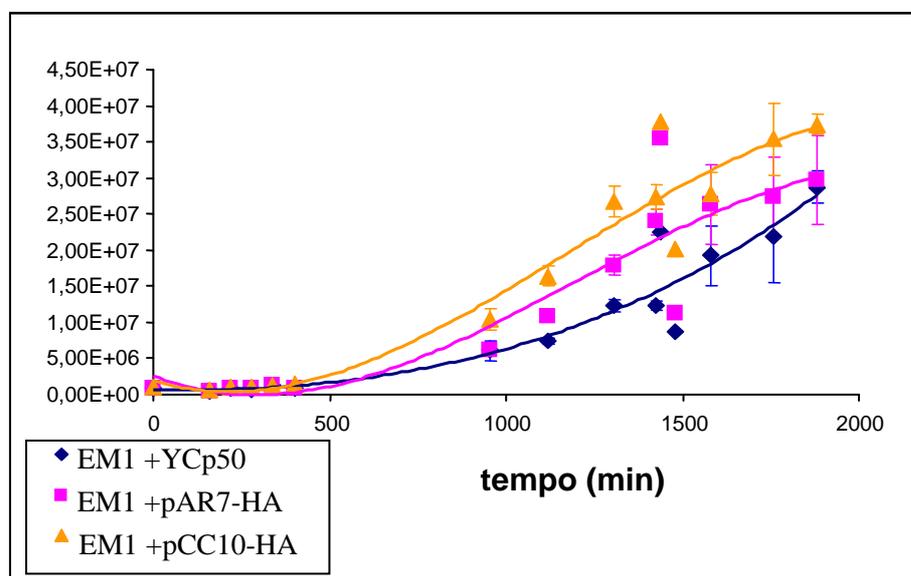
Dopo aver isolato e verificato il clone positivo si è proceduto con il ripristino della Top1 tramite trasformazione con i plasmidi pCC10HA, pAR7HA e YCp50 al fine di valutare l'effetto di Top1 sull'espressione del marcatore clonato nella regione telomerica valutando nei tre ceppi la cinetica di crescita in terreno selettivo e non selettivo per istidina.

I risultati in figura 79 mostrano che i ceppi EM1 con i plasmidi YCp50, pCC10HA e pAR7HA presentano un andamento della curva di crescita molto simile; è percettibile che l'assenza di Top1 rallenta leggermente la crescita e la presenza di Top1 wt e mutata ha il medesimo effetto sulla crescita sebbene la mutazione di Top1, come la sua assenza,

sembrano allungare la fase di latenza. Per controllo è stata allestita una curva di crescita degli stessi ceppi in terreno non selettivo per l'istidina (figura 80).



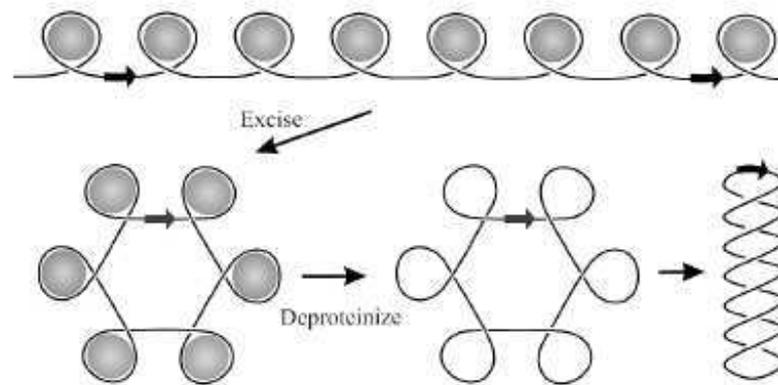
**Figura 79.** Curva di crescita di EM1 con i plsmidi YCp50, pCC10HA e pAR7HA in terreno URA-HIS-. Le barre verticali indicano l'errore standard per i punti in cui è stata fatta più di una determinazione.



**Figura 80.** Curva di crescita di EM1 con i plsmidi YCp50, pCC10HA e pAR7HA in terreno URA-. Le barre verticali indicano l'errore standard per i punti in cui è stata fatta più di una determinazione.

Le cinetiche di crescita di *Jel1 Δtop1 ΔADE2 HIS+* con Top1 wt, Top1 mutata e in assenza di Top1 sono molto simili tra loro, sia nel caso di cellule cresciute in un terreno con istidina sia di terreno senza istidina. Con questo metodo di indagine non siamo in grado di cogliere nessun effetto di Top1 sull'espressione del marcatore e quindi sulla crescita cellulare probabilmente perché la cellula di lievito ha bisogno di un bassissimo livello di espressione del gene *HIS5* per sopravvivere. E' stato da tempo riportato l'utilizzo del 3-AT (3-ammino-1,2,4-triazolo) come competitore del prodotto di *HIS3* di *S. cerevisiae* e *HIS5* di *S. pombe* (88). A dosi crescenti del competitore corrispondono crescenti livelli di trascrizione di *HIS*, per cui, in queste condizioni, potrebbe essere valutato l'effetto di Top1 sull'attivazione della risposta trascrizione di *HIS5*.

Molto utile a chiarire il ruolo di Top1 e della sua attività catalitica nel telomero, sarà inoltre l'analisi del numero di nucleosomi e della struttura topologica di microcircoli telomerici ottenuti con l'excisione del marcatore *HIS5*, in seguito a ricombinazione sito specifica dei LociP, inducendo l'espressione della ricombinasi Cre (figura 81).



**Figura 81. Strategia per analizzare la topologia di DNA cromosomico nel suo locus endogeno. La ricombinazione fra i due siti inseriti al fianco della regione di interesse, permette l'excisione di un mini-cromosoma circolare. Figura tratta da Bi, 1997.**

## Capitolo 4

# DISCUSSIONE

---

## Discussione

In questo lavoro, abbiamo raccolto molte evidenze sperimentali per una nuova funzione della Topoisomerasi I in cellule eucariotiche di lievito.

Innanzitutto, a livello globale, abbiamo verificato che cellule che esprimono Top1 wt crescono più velocemente nella fase esponenziale rispetto alle cellule senza l'enzima o con un enzima mutato, che seguono un andamento più lento ed hanno un ritardo iniziale più lungo, in terreno sintetico completo in condizioni di crescita fisiologiche (pH 6.2) e non fisiologiche (terreno tamponato a pH 7.0, crescita). Il consumo di glucosio per i tre ceppi è identico, nonostante le differenze indicate nella crescita. Ciò suggerisce che le cellule senza una Top1 funzionale non sono in grado di consumare efficientemente il glucosio, e ottimizzare il metabolismo per la crescita cellulare. Top1 wt conferisce, quindi, una capacità di crescita più rapida ed ottimale delle cellule di lievito nelle comuni condizioni di laboratorio.

La valutazione dei profili di espressione genica influenzati da Top1 ha indicato che il 9.4% dei geni risponde con una variazione dell'espressione, aumento o diminuzione, con variazioni di un fattore pari o maggiore a 1.8. Questi risultati indicano una marcata influenza della Top1 sulla trascrizione globale dipendente dalla RNA polimerasi II nelle condizioni sperimentali utilizzate.

L'analisi dei percorsi metabolici alterati da Top1 ha indicato che il metabolismo del glucosio ed il metabolismo energetico sono incrementati dall'enzima, in particolare la glicolisi ed i percorsi metabolici a valle del ciclo di Krebs, e che il metabolismo del galattosio è represso, in maniera coerente con l'aumento dell'utilizzazione del glucosio.

Geni alterati mostrano, inoltre, differenze di localizzazione, a livello cromosomico, molto significative. Infatti, il fatto che i geni repressi siano stati localizzati nelle regioni telomeriche e subtelomeriche mentre i geni più espressi siano uniformemente dispersi, indica indubbiamente che Top1 ha uno specifico ruolo repressivo alle terminazioni dei cromosomi di lievito in condizioni di crescita ottimali e all'inizio della fase esponenziale.

Top1 reprime, quindi, i geni responsabili dell'importo cellulare di zuccheri alternativi, che sono collocati spesso nelle regioni subtelomeriche: questi risultati sono coerenti con l'aumento da parte di Top1 dell'utilizzazione del glucosio per la

produzione di energia, e con la repressione dell'utilizzazione degli zuccheri alternativi e dell'espressione dei geni sub-telomerici.

L'insieme di questi risultati permette di tracciare una prima conclusione sulle funzioni cellulari di Top1. L'enzima aumenta la velocità di crescita cellulare ottimizzando i profili di trascrizione, aumentando il consumo di glucosio e la produzione di energia, e reprimendo i geni che non sono necessari (come quelli che **si** localizzano vicino ai telomeri) nelle comuni condizioni di crescita di laboratorio. Abbiamo verificato che in condizioni di stress da pH, Top1 non mostra una specifica repressione dei geni telomerici e sub-telomerici e non aumenta l'espressione dei geni per il consumo del glucosio e del metabolismo energetico nelle condizioni ottimali di crescita cellulare.

Già in studi precedenti (45) era stato dimostrato che Top1 fosse necessaria per la repressione generale della trascrizione in tarda fase stazionaria in *S. cerevisiae*. Mutazioni di Top1, infatti, rendono inefficiente la repressione della trascrizione, richiedendo tempi più lunghi e suggerendo un ruolo per Top1 nell'ottimizzazione del programma di trascrizionale della fase stazionaria.

La funzione globale di Top1 nella regolazione dell'espressione genica può essere associata alla regolazione degli stress torsionali in maniera simile a quanto già noto in cellule procariotiche. Nei batteri, il superavvolgimento del DNA è strettamente regolato dalle DNA Topoisomerasi e da proteine simili ad istoni (89) ed il grado di superavvolgimento può regolare l'espressione genica (90; 91). Come diversi cambiamenti ambientali possono avere effetto sul superavvolgimento di DNA genomici di *E. coli*, è stato suggerito che variazioni del superavvolgimento del DNA siano un meccanismo tramite il quale gli stimoli esterni possano essere comunicati al macchinario trascrizionale.

Un lavoro recente (92) mostra che il 7% dei geni di *E. coli* sono influenzati dal superavvolgimento del DNA ed i geni influenzati sono funzionalmente differenti, indicando che il superavvolgimento può trasmettere informazioni ambientali a molti network regolatori. Inoltre, mutazioni selezionate attraverso la selezione in vitro di batteri adattatisi ad un ambiente periodicamente povero di nutrienti sono state trovate a carico di geni che regolano il superavvolgimento del DNA in *E. coli*. Ciò indica che la

regolazione del superavvolgimento è un bersaglio della selezione in esperimenti di adattamento all'evoluzione (93).

A questo punto, abbiamo cercato di definire il/i meccanismi molecolari attraverso cui Top1 esercita la regolazione della trascrizione. Gli effetti di Top1 riportati sull'espressione genica globale in lievito possono essere una conseguenza diretta oppure un effetto secondario dell'attività di Top1. Non possiamo escludere la possibilità che gli effetti di Top1 sulla crescita cellulare e sui livelli di trascritti specifici siano secondari e successivi ad altre attività enzimatiche.

A favore di quest'ultima ipotesi, c'è l'osservazione che, sebbene Top1 non alteri i livelli di trascritto delle proteine Sir e delle molecole istoniche in generale, gli enzimi NPT1 e PNC1, cruciali nel percorso di recupero del NAD<sup>+</sup>, subiscono un aumento in presenza di Top1. Il percorso di recupero del NAD<sup>+</sup> è una via metabolica presente nelle cellule che serve a rigenerare il NAD<sup>+</sup> consumato dalle deacetilasi tra cui Sir2p. L'aumento dell'espressione genica di questi enzimi potrebbe quindi evitare una inibizione di Sir2p (deacetilasi) dovuta a una carenza di Npt1p e Pnc1p. Il fatto che Sir2p possa funzionare in modo più efficiente in presenza di Top1 potrebbe contribuire alla repressione dei geni delle regioni telomeriche e sub-telomeriche che naturalmente sono silenziate in lieviti cresciuti in condizioni ottimali e attivate invece in condizioni di stress per la cellula.

I risultati presentati, tuttavia, indicano che almeno alcuni degli effetti trascrizionali sono dovuti direttamente all'attività dell'enzima. Abbiamo dimostrato, infatti, Top1 wt e Top1 Y727F localizzano preferenzialmente su siti genomici specifici, tra i quali ci sono le ripetizioni telomeriche, in accordo con quanto riportato in precedenza relativamente alla localizzazione di top1 sui telomeri di cellule umane (63). Inoltre, il legame di Top1 wt e Top1 Y727F è stato rilevato anche in altri siti genomici, quali i siti NTS1 e NTS2 che appartengono a regioni regolatorie non trascritte dei geni per il DNA ribosomale, in accordo con il fatto che tali regioni erano già state individuate come siti di legame e di taglio da parte di Top1 (52). Anche la Top1 genomica, fusa al TAP (figura 66), è stata localizzata sulle ripetizioni del DNA telomerico, in accordo con i risultati già visti nel ceppo di *S. cerevisiae* precedentemente indagato ed indicando che Top1 mostra un sito di legame preferenziale per le terminazioni cromosomiche.

Abbiamo dimostrato che Top1 è cataliticamente attiva nelle ripetizioni telomeriche in lievito. L'attività enzimatica influenza fortemente le modificazioni istoniche lungo la sequenza telomerica analizzata, in quanto l'acetilazione relativa alle lisine 5, 8, 12 e 16 dell'istone H4 è sensibilmente ridotta da Top1 wt in quasi tutte le posizioni telomeriche analizzate, rispetto all'enzima Top1 inattivo e all'assenza dell'enzima stesso. Una riduzione della tetra-acetilazione di H4 è stata osservata anche ai siti regolatori del rDNA NTS1 e NTS2, in accordo con i dati pubblicati sugli effetti di Top1 sulle lisine 12 e 16 in queste regioni (54). I livelli di tetra-acetilazione di H4 sono molto simili, invece, negli altri loci genomici osservati confrontando cellule che esprimono Top1 wt, mutata o in assenza dell'enzima, indicando che l'effetto di Top1 wt sull'acetilazione dell'istone è specifico delle regioni subtelomeriche e dei siti ribosomali. Più specificamente, anche l'acetilazione della lisina 16 sull'istone H4, bersaglio della deacetilasi Sir2 e dell'acetilasi Sas2, è ridotta da Top1 wt. Top1 potrebbe essere coinvolta in meccanismi di regolazione della struttura della cromatina in diverse regioni genomiche, incluso il locus del DNA ribosomale (54).

L'acetilazione della lisina 16 sull'istone H4, al contrario, è drasticamente aumentata dall'enzima inattivo Y727F rispetto all'assenza dell'enzima. Il mutante di Top1 aumenta di 2-3 volte i livelli di acetilazione nella regione subtelomerica del cromosoma XIV: questi effetti di Top1 Y727F indicano che l'attività enzimatica potrebbe interferire con l'attività deacetilasica e quindi con il meccanismo del silencing più in generale.

Anche i livelli di reclutamento di Sir3 risultano in parte alterati dall'attività enzimatica di Top1, nel senso che il reclutamento di Sir3 aumenta da 1.5 a 2.0 volte nelle regioni di confine delle ripetizioni telomeriche, vicino alla regione in cui sono stati osservati minori livelli di acetilazione della lisina 16 su H4. La top1 Y727F non ha effetti sul reclutamento di Sir3 relativamente all'assenza dell'enzima.

Le due proteine, inoltre, hanno effetto differente ed opposto sui livelli di dimetilazione della lisina 4 sull'istone H3 nei siti analizzati sul telomero destro del cromosoma XIV, indicando un effetto dell'attività enzimatica sito-specifica per il telomero in quanto non si osservano effetti simili nella regione regolatoria per l'rDNA, NTS2.

I risultati descritti individuano un ruolo forte per Top1 nella regolazione dell'espressione dei geni telomerici, che avviene attraverso un'interazione diretta di Top1 sulle ripetizioni telomeriche stesse e si realizza interferendo con il meccanismo di regolazione delle modificazioni istoniche e con l'eterocromatina SIR-dipendente delle ripetizioni telomeriche.

In *S. cerevisiae*, acetilazione e metilazione degli istoni sono associate alla cromatina attiva, e le proteine SIR legano preferenzialmente gli istoni non modificati. Di conseguenza, la perdita delle modificazioni istoniche osservate con Top1 wt potrebbe favorire lo stato represso della cromatina per aumentata affinità con le proteine SIR, come si pensa dall'incremento dei livelli di recupero di Sir3 su alcune regioni di confine.

L'attività enzimatica di Top1 potrebbe determinare un legame specifico delle proteine SIR nelle regioni subtelomeriche, aumentando la loro effettiva concentrazione e rafforzando il silencing ai normali loci silenziati. In maniera inversa, la mutazione dell'attività catalitica potrebbe aumentare le modificazioni istoniche dei loci normalmente silenziosi e prevenire l'associazione delle SIR. Secondo questa ipotesi, dunque, l'attività di Top1 sulla regolazione trascrizionale dei geni telomerici si potrebbe realizzare attraverso il meccanismo di redistribuzione delle proteine SIR.

La funzione della cromatina silenziata è quella di prevenire la trascrizione, ma, sorprendentemente, ben poco è conosciuto riguardo all'esatto meccanismo con cui la cromatina silenziata blocca la trascrizione. La maggior parte dei modelli propongono che la struttura compatta di "cromatina-complessi Sir" inibisca l'associazione di RNA PolIII con il DNA a causa di un meccanismo di ingombro sterico. Tuttavia, nella regione di HMR, la TATA binding protein (TBP) e RNA PolIII sono entrambe presenti alla regione promotrice anche quando il gene è silenziato (94). Del resto, componenti del complesso di preinizio sono associati al promotore CYC1 represso in *S. cerevisiae* (95) e con promotori di geni di *Drosophila* repressi da proteine del gruppo policomb (96).

Questi risultati sono coerenti con l'ipotesi che le proteine SIR blocchino uno step successivo alla formazione del complesso di preinizio. Molti sono gli step regolabili nel processo di trascrizione, dall'assemblaggio del complesso di preinizio alla formazione del complesso aperto, dalla disponibilità del promoter all'elongazione, e per molti di essi già è noto il coinvolgimento diretto di Top1.

Le proteine SIR potrebbero inibire la trascrizione in molti modi: attraverso la deacetilazione di un fattore di trascrizione, riducendone l'attività, oppure, attraverso l'alterazione delle proprietà dei nucleosomi in modo tale da bloccare la disponibilità del promotore o l'elongazione. Il legame delle proteine SIR al nucleosoma potrebbe rendere la struttura molto più rigida e meno capace di seguire i cambiamenti conformazionali necessari per la trascrizione, inclusi i riarrangiamenti strutturali, gli spostamenti del dimeri H2A-H2B, o gli spostamenti dell'intero nucleosoma.

D'altro canto, l'influenza di Top1 sulle modificazioni istoniche potrebbe passare per l'interazione della proteina con altri enzimi che modificano gli istoni, come per Top2 umana per la quale è stata dimostrata l'interazione con altre deacetilasi istoniche (97), per cui l'effetto di redistribuzione delle SIR potrebbe essere un effetto successivo a queste interazioni. Poco, dunque, è ancora chiaro relativamente al meccanismo attraverso cui Top1 è coinvolta nella regolazione della trascrizione *associata* al silencing telomeric.

Tuttavia, l'identificazione di una nuova funzione molecolare per Top1 è particolarmente rilevante, insieme alle conseguenze cellulari e farmacologiche dell'inibizione di tale funzione, alla luce del fatto che la proteina è over-espressa in molte cellule tumorali umane (98) ed i risultati qui riportati suggeriscono che essa possa favorire la proliferazione cellulare attraverso un'aumentata efficienza del programma trascrizionale e contribuendo alla stabilità dei telomeri.

# APPENDICE

---

**Tabella A. Geni di *Saccharomyces cerevisiae* up regolati da Top1 Wt.**

Gene	Common Name	Fold Change	P-value	Description
YNL031C	HHT2	6.4	0	One of two identical histone H3 proteins (see also HHT1); core histone required for chromatin assembly, involved in heterochromatin-mediated telomeric and HM silencing; regulated by acetylation, methylation, and mitotic phosphorylation
YLR339C	YLR339C	5.91	0	hypothetical protein; open reading frame overlaps 5' end of essential RPP0 gene encoding a component of the ribosome
YNL190W	YNL190W	5.21	2.61E-04	hypothetical protein
YLR355C	ILV5	4.98	0	Acetohydroxyacid reductoisomerase, mitochondrial protein involved in branched-chain amino acid biosynthesis, also required for maintenance of wild-type mitochondrial DNA
YBR010W	HHT1	4.87	0.04	One of two identical histone H3 proteins (see also HHT2); core histone required for chromatin assembly, involved in heterochromatin-mediated telomeric and HM silencing; regulated by acetylation, methylation, and mitotic phosphorylation
YER043C	SAH1	4.78	7.35E-06	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase, catabolizes S-adenosyl-L-homocysteine which is formed after donation of the activated methyl group of S-adenosyl-L-methionine (AdoMet) to an acceptor
YHL015W	RPS20	4.36	2.39E-09	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit; overproduction suppresses mutations affecting RNA polymerase III-dependent transcription; has similarity to E. coli S10 and rat S20 ribosomal proteins
YGL256W	ADH4	4.34	1.78E-10	Alcohol dehydrogenase type IV, dimeric enzyme demonstrated to be zinc-dependent despite sequence similarity to iron-activated alcohol dehydrogenases; transcription is induced in response to zinc deficiency; alcohol dehydrogenase isoenzyme IV
YML123C	PHO84	4.31	2.30E-10	High-affinity inorganic phosphate (Pi) transporter and low-affinity manganese transporter; regulated by Pho4p and Spt7p; mutation confers resistance to arsenate; exit from the ER during maturation requires Pho86p
YBR196C	PGI1	3.98	0	Glycolytic enzyme phosphoglucose isomerase, catalyzes the interconversion of glucose-6-phosphate and fructose-6-phosphate; required for cell cycle progression and completion of the gluconeogenic events of sporulation
YPR080W	TEF1	3.91	0	Translational elongation factor EF-1 alpha; also encoded by TEF2; functions in the binding reaction of aminoacyl-tRNA (AA-tRNA) to ribosomes
YBR039W	ATP3	3.87	0.02	Gamma subunit of the F1 sector of mitochondrial F1F0 ATP synthase, which is a large, evolutionarily conserved enzyme complex required for ATP synthesis
YNL066W	SUN4	3.85	5.46E-08	Cell wall protein related to glucanases, possibly involved in cell wall septation; member of the SUN family
YGL054C	ERV14	3.79	0.03	Protein localized to COPII-coated vesicles, involved in vesicle formation and incorporation of specific secretory cargo; required for the delivery of bud-site selection protein Axl2p to cell surface; related to <i>Drosophila</i> cornichon
YMR120C	ADE17	3.75	0.02	Enzyme of 'de novo' purine biosynthesis containing both 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide transformylase and inosine monophosphate cyclohydrolase activities, isozyme of Ade16p; ade16 ade17 mutants require adenine and histidine
YBR097W	VPS15	3.65	8.57E-04	Myristoylated serine/threonine protein kinase involved in vacuolar protein sorting; functions as a membrane-associated complex with Vps34p; active form recruits Vps34p to the Golgi membrane; interacts with the GDP-bound form of Gpa1p
YNL052W	COX5A	3.62	3.58E-06	Subunit Va of cytochrome c oxidase, which is the terminal member of the mitochondrial inner membrane electron transport chain; predominantly expressed during aerobic growth while its isoform Vb (Cox5Bp) is expressed during anaerobic growth
YLR295C	ATP14	3.56	6.71E-04	Subunit h of the F0 sector of mitochondrial F1F0 ATP synthase, which is a large, evolutionarily conserved enzyme complex required for ATP synthesis

YPL135W	ISU1	3.55	0	Conserved protein of the mitochondrial matrix, performs a scaffolding function during assembly of iron-sulfur clusters, interacts physically and functionally with yeast frataxin (Yfh1p); isu1 isu2 double mutant is inviable
YCR024C-A	PMP1	3.52	3.51E-04	Small single-membrane span proteolipid that functions as a regulatory subunit of the plasma membrane H(+)-ATPase Pma1p, forms unique helix and positively charged cytoplasmic domain that is able to specifically segregate phosphatidylserines
YDR210W	YDR210W	3.47	0.03	Protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cell periphery
YLR180W	SAM1	3.39	0.01	S-adenosylmethionine synthetase, catalyzes transfer of the adenosyl group of ATP to the sulfur atom of methionine; one of two differentially regulated isozymes (Sam1p and Sam2p)
YMR095C	SNO1	3.36	1.35E-04	Protein of unconfirmed function, involved in pyridoxine metabolism; expression is induced during stationary phase; forms a putative glutamine amidotransferase complex with Snz1p, with Sno1p serving as the glutaminase
YDL015C	TSC13	3.36	6.63E-04	Enoyl reductase that catalyzes the last step in each cycle of very long chain fatty acid elongation, localizes to the ER, highly enriched in a structure marking nuclear-vacuolar junctions, coimmunoprecipitates with elongases Fen1p and Sur4p
YBL030C	PET9	3.32	0	Major ADP/ATP carrier of the mitochondrial inner membrane, exchanges cytosolic ADP for mitochondrially synthesized ATP; required for viability in many common lab strains carrying a mutation in the polymorphic SAL1 gene
YGR155W	CYS4	3.3	4.14E-07	Cystathionine beta-synthase, catalyzes the synthesis of cystathionine from serine and homocysteine, the first committed step in cysteine biosynthesis
YPR191W	QCR2	3.3	0.03	Subunit 2 of the ubiquinol cytochrome-c reductase complex, which is a component of the mitochondrial inner membrane electron transport chain; transcription is regulated by Hap1p, Hap2p/Hap3p, and heme
YDR281C	PHM6	3.27	0	Protein of unknown function, expression is regulated by phosphate levels
YER062C	HOR2	3.26	0.01	One of two redundant DL-glycerol-3-phosphatases (RHR2/GPP1 encodes the other) involved in glycerol biosynthesis; induced in response to hyperosmotic stress and oxidative stress, and during the diauxic transition
YNL160W	YGP1	3.2	0	Cell wall-related secretory glycoprotein; induced by nutrient deprivation-associated growth arrest and upon entry into stationary phase; may be involved in adaptation prior to stationary phase entry; has similarity to Sps100p
YLR041W	YLR041W	3.2	0.02	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein, based on available experimental and comparative sequence data; partially overlaps the uncharacterized ORF YLR040C
YBR296C	PHO89	3.19	0	Na <sup>+</sup> /Pi cotransporter, active in early growth phase; similar to phosphate transporters of <i>Neurospora crassa</i> ; transcription regulated by inorganic phosphate concentrations and Pho4p
YJL004C	SYS1	3.19	0	Integral membrane protein of the Golgi required for targeting of the Arf-like GTPase Arl3p to the Golgi; multicopy suppressor of ypt6 null mutation
YJR070C	LIA1	3.18	1.29E-06	Deoxyhypusine hydroxylase, a HEAT-repeat containing metalloenzyme that catalyses hypusine formation; binds to and is required for the modification of Hyp2p (eIF5A); complements <i>S. pombe</i> mmd1 mutants defective in mitochondrial positioning
YKL067W	YNK1	3.18	3.34E-05	Nucleoside diphosphate kinase, catalyzes the transfer of gamma phosphates from nucleoside triphosphates, usually ATP, to nucleoside diphosphates by a mechanism that involves formation of an autophosphorylated enzyme intermediate
YPR170C	YPR170C	3.18	0.01	hypothetical protein
YLR093C	NYV1	3.14	0.01	v-SNARE component of the vacuolar SNARE complex involved in vesicle fusion; inhibits ATP-dependent Ca(2+) transport activity of Pmc1p in the vacuolar membrane
YPR028W	YOP1	3.13	1.50E-04	Membrane protein that interacts with Yip1p to mediate membrane traffic; overexpression results in cell death and accumulation of internal cell membranes; regulates vesicular traffic in stressed cells

YFL037W	TUB2	3.1	0.01	Beta-tubulin; associates with alpha-tubulin (Tub1p and Tub3p) to form tubulin dimer, which polymerizes to form microtubules
YBR224W	YBR224W	3.09	0.01	hypothetical protein
YJL012C	VTC4	3.07	7.63E-06	Vacuolar membrane protein involved in vacuolar polyphosphate accumulation; functions as a regulator of vacuolar H <sup>+</sup> -ATPase activity and vacuolar transporter chaperones; involved in non-autophagic vacuolar fusion
YBR118W	TEF2	3.06	1.21E-06	Translational elongation factor EF-1 alpha; also encoded by TEF1; functions in the binding reaction of aminoacyl-tRNA (AA-tRNA) to ribosomes
YGL040C	HEM2	3.03	9.41E-05	Delta-aminolevulinatase dehydratase, a homo-octameric enzyme, catalyzes the conversion of delta-aminolevulinic acid to porphobilinogen, the second step in the heme biosynthetic pathway; localizes to both the cytoplasm and nucleus
YLR230W	YLR230W	3.02	8.70E-04	hypothetical protein; open reading frame overlaps 5' end of essential CDC42 gene encoding a small Rho-like GTPase essential for establishment and maintenance of cell polarity
YKR065C	PAM17	3	0	Presequence translocase-associated motor subunit, required for stable complex formation between cochaperones Pam16p and Pam18p, promotes association of Pam16p-Pam18p with the presequence translocase
YGR233C	PHO81	3	0.01	Cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor, regulates Pho80p-Pho85p and Pcl7p-Pho85p cyclin-CDK complexes in response to phosphate levels; required for derepression of PHO5; transcriptionally regulated by Pho4p and Pho2p
YGL187C	COX4	3	0.05	Subunit IV of cytochrome c oxidase, which is the terminal member of the mitochondrial inner membrane electron transport chain; N-terminal 25 residues of precursor are cleaved during mitochondrial import
YJL034W	KAR2	2.99	0	ATPase involved in protein import into the ER, also acts as a chaperone to mediate protein folding in the ER and may play a role in ER export of soluble proteins; regulates the unfolded protein response via interaction with Ire1p
YDR417C	YDR417C	2.99	1.35E-05	hypothetical protein
YHR143W	DSE2	2.99	0.02	Daughter cell-specific secreted protein with similarity to glucanases, degrades cell wall from the daughter side causing daughter to separate from mother; expression is repressed by cAMP
YNL057W	YNL057W	2.89	0.02	hypothetical protein
YBR036C	CSG2	2.88	0.04	Endoplasmic reticulum membrane protein, required for mannosylation of inositolphosphorylceramide and for growth at high calcium concentrations
YOR045W	TOM6	2.85	2.65E-04	Component of the TOM (translocase of outer membrane) complex responsible for recognition and initial import steps for all mitochondrially directed proteins; promotes assembly and stability of the TOM complex
YLR134W	PDC5	2.84	6.89E-04	Minor isoform of pyruvate decarboxylase, key enzyme in alcoholic fermentation, decarboxylates pyruvate to acetaldehyde, regulation is glucose- and ethanol-dependent, repressed by thiamine, involved in amino acid catabolism
YOL058W	ARG1	2.81	0.01	Arginosuccinate synthetase, catalyzes the formation of L-argininosuccinate from citrulline and L-aspartate in the arginine biosynthesis pathway; potential Cdc28p substrate
YCR004C	YCP4	2.78	4.75E-04	Protein of unknown function, has sequence and structural similarity to flavodoxins; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm in a punctate pattern
YNR036C	YNR036C	2.76	0	Putative mitochondrial ribosomal protein of the small subunit, has similarity to E. coli and human mitochondrial S12 ribosomal proteins
YLR395C	COX8	2.76	8.10E-04	Subunit VIII of cytochrome c oxidase, which is the terminal member of the mitochondrial inner membrane electron transport chain
YOR146W	YOR146W	2.76	0.03	hypothetical protein; open reading frame overlaps 5' end of essential PNO1 gene required for pre-18S rRNA processing
YER091C	MET6	2.74	6.29E-05	Cobalamin-independent methionine synthase, involved in amino acid biosynthesis; requires a minimum of two glutamates on the methyltetrahydrofolate substrate, similar to bacterial metE homologs
YGL258W	VEL1	2.73	0	Protein of unknown function; highly induced in zinc-depleted conditions and has increased expression in NAP1 deletion mutants

YDL232W	OST4	2.73	0.01	Subunit of the oligosaccharyltransferase complex of the ER lumen, which catalyzes protein asparagine-linked glycosylation; type I membrane protein required for incorporation of Ost3p or Ost6p into the OST complex
YBR054W	YRO2	2.73	0.02	Putative plasma membrane protein of unknown function, transcriptionally regulated by Haa1p; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cell periphery and bud
YNL122C	YNL122C	2.73	0.02	Putative protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to mitochondria; YNL122C is not an essential gene
YBL045C	COR1	2.72	0	Core subunit of the ubiquinol-cytochrome c reductase complex (bc1 complex), which is a component of the mitochondrial inner membrane electron transport chain
YPL019C	VTC3	2.71	1.64E-04	Vacuolar membrane protein involved in vacuolar polyphosphate accumulation; functions as a regulator of vacuolar H <sup>+</sup> -ATPase activity and vacuolar transporter chaperones; involved in non-autophagic vacuolar fusion
YLL044W	YLL044W	2.71	0.05	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein, based on available experimental and comparative sequence data; partially overlaps verified gene RPL8
YDL004W	ATP16	2.69	0.01	Delta subunit of the central stalk of mitochondrial F1F0 ATP synthase, which is a large, evolutionarily conserved enzyme complex required for ATP synthesis
YMR116C	ASC1	2.69	0.01	WD repeat protein (G-beta like protein) involved in translation regulation; required for repression of Gcn4p activity in the absence of amino-acid starvation; core component of the ribosome; ortholog of mammalian RACK1
YER178W	PDA1	2.68	1.80E-05	E1 alpha subunit of the pyruvate dehydrogenase (PDH) complex, catalyzes the direct oxidative decarboxylation of pyruvate to acetyl-CoA, regulated by glucose
YBR151W	APD1	2.68	1.40E-04	Protein of unknown function, required for normal localization of actin patches and for normal tolerance of sodium ions and hydrogen peroxide; localizes to both cytoplasm and nucleus
YPR110C	RPC40	2.68	0.01	RNA polymerase subunit, common to RNA polymerase I and III
YNL111C	CYB5	2.67	7.55E-04	Cytochrome b5, involved in the sterol and lipid biosynthesis pathways; required for sterol C5-6 and fatty acid desaturation
YKL137W	YKL137W	2.67	0.01	Putative protein of unknown function; mutation results in growth defect on a non-fermentable (respiratory) carbon source
YOR122C	PFY1	2.66	9.62E-04	Profilin, actin- and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-binding protein, plays a role in cytoskeleton organization, required for normal timing of actin polymerization in response to thermal stress; localizes to plasma membrane and cytosol
YPL187W	MF(ALPHA)1	2.66	0.03	Mating pheromone alpha-factor, made by alpha cells; interacts with mating type a cells to induce cell cycle arrest and other responses leading to mating; also encoded by MF(ALPHA)2, although MF(ALPHA)1 produces most alpha-factor
YPL095C	EEB1	2.65	9.02E-04	Acyl-coenzymeA:ethanol O-acyltransferase responsible for the major part of medium-chain fatty acid ethyl ester biosynthesis during fermentation; possesses short chain esterase activity; may be involved in lipid metabolism and detoxification
YER072W	VTC1	2.63	0.01	Vacuolar transporter chaperon (VTC) involved in distributing V-ATPase and other membrane proteins; together with other VTC proteins, forms a heterotetrameric complex that associates with the SNARE Nyv1p and the V0 sector of the V-ATPase
YOR117W	RPT5	2.63	0.03	One of six ATPases of the 19S regulatory particle of the 26S proteasome involved in the degradation of ubiquitinated substrates; recruited to the GAL1-10 promoter region upon induction of transcription
YNL015W	PBI2	2.61	0	Cytosolic inhibitor of vacuolar proteinase B, required for efficient vacuole inheritance; with thioredoxin forms protein complex LMA1, which assists in priming SNARE molecules and promotes vacuole fusion
YDR502C	SAM2	2.61	1.89E-04	S-adenosylmethionine synthetase, catalyzes transfer of the adenosyl group of ATP to the sulfur atom of methionine; one of two differentially regulated isozymes (Sam1p and Sam2p)

YOL007C	CSI2	2.61	0.01	Protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)- fusion protein localizes to the mother side of the bud neck and the vacuole; YOL007C is not an essential gene
YLR217W	YLR217W	2.61	0.05	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein, based on available experimental and comparative sequence data; partially overlaps the verified gene CPR6
YPL061W	ALD6	2.6	3.59E-04	Cytosolic aldehyde dehydrogenase that is activated by Mg <sup>2+</sup> and utilizes NADP <sup>+</sup> as the preferred coenzyme; required for the conversion of acetaldehyde to acetate; constitutively expressed
YLL024C	SSA2	2.59	3.88E-05	ATP binding protein involved in protein folding and vacuolar import of proteins; member of heat shock protein 70 (HSP70) family; associated with the chaperonin-containing T-complex; present in the cytoplasm, vacuolar membrane and cell wall
YBR009C	HHF1	2.58	0	One of two identical histone H4 proteins (see also HHF2); core histone required for chromatin assembly and chromosome function; contributes to telomeric silencing; N-terminal domain involved in maintaining genomic integrity
YMR015C	ERG5	2.58	0	C-22 sterol desaturase, a cytochrome P450 enzyme that catalyzes the formation of the C-22(23) double bond in the sterol side chain in ergosterol biosynthesis; may be a target of azole antifungal drugs
YOR008C	SLG1	2.58	0	Sensor-transducer of the stress-activated PKC1-MPK1 kinase pathway involved in maintenance of cell wall integrity; involved in organization of the actin cytoskeleton; secretory pathway Wsc1p is required for the arrest of secretion response
YDR077W	SED1	2.58	0.01	Major stress-induced structural GPI-cell wall glycoprotein in stationary-phase cells, associates with translating ribosomes, possible role in mitochondrial genome maintenance; ORF contains two distinct variable minisatellites
YNL081C	SWS2	2.58	0.01	Putative mitochondrial ribosomal protein of the small subunit, has similarity to E. coli S13 ribosomal protein
YDR377W	ATP17	2.57	0	Subunit f of the F0 sector of mitochondrial F1F0 ATP synthase, which is a large, evolutionarily conserved enzyme complex required for ATP synthesis
YOR240W	YOR240W	2.57	2.70E-04	Merged open reading frame, does not encode a discrete protein; YOR240W was originally annotated as an independent ORF, but was later demonstrated to be part of an adjacent ORF, YOR239W, via a +1 translational frameshift
YDR084C	TVP23	2.57	0.03	Integral membrane protein localized to late Golgi vesicles along with the v-SNARE Tlg2p; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm in a punctate pattern
YOR142W	LSC1	2.56	0.01	Alpha subunit of succinyl-CoA ligase, which is a mitochondrial enzyme of the TCA cycle that catalyzes the nucleotide-dependent conversion of succinyl-CoA to succinate
YGR167W	CLC1	2.54	5.47E-04	Clathrin light chain, subunit of the major coat protein involved in intracellular protein transport and endocytosis; thought to regulate clathrin function, two Clathrin heavy chains (CHC1) form the clathrin triskelion structural component
YIL010W	DOT5	2.53	0.05	Nuclear thiol peroxidase which functions as an alkyl-hydroperoxide reductase during post-diauxic growth
YJR077C	MIR1	2.52	0	Mitochondrial phosphate carrier, imports inorganic phosphate into mitochondria; functionally redundant with Pic2p but more abundant than Pic2 under normal conditions
YOL080C	REX4	2.51	0	Putative RNA exonuclease possibly involved in pre-rRNA processing and ribosome assembly
YPL131W	RPL5	2.51	4.19E-04	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit with similarity to E. coli L18 and rat L5 ribosomal proteins; binds 5S rRNA and is required for 60S subunit assembly
YFL031W	HAC1	2.5	5.96E-04	bZIP transcription factor (ATF/CREB1 homolog) that regulates the unfolded protein response, via UPRE binding, and membrane biogenesis; ER stress-induced splicing pathway utilizing Ire1p, Trl1p and Ada5p facilitates efficient Hac1p synthesis
YJR045C	SSC1	2.5	0.01	Mitochondrial matrix ATPase that is a subunit of the presequence translocase-associated protein import motor (PAM); involved in protein translocation into the matrix and protein folding; member of the heat shock protein 70 (HSP70) family

YNL307C	MCK1	2.48	0.01	Protein serine/threonine/tyrosine (dual-specificity) kinase involved in control of chromosome segregation and in regulating entry into meiosis; related to mammalian glycogen synthase kinases of the GSK-3 family
YJR121W	ATP2	2.48	0.05	Beta subunit of the F1 sector of mitochondrial F1F0 ATP synthase, which is a large, evolutionarily conserved enzyme complex required for ATP synthesis
YOR136W	IDH2	2.46	0	Subunit of mitochondrial NAD(+)-dependent isocitrate dehydrogenase, which catalyzes the oxidation of isocitrate to alpha-ketoglutarate in the TCA cycle
YPR035W	GLN1	2.46	0.01	Glutamine synthetase (GS), synthesizes glutamine from glutamate and ammonia; with Glt1p, forms the secondary pathway for glutamate biosynthesis from ammonia; expression regulated by nitrogen source and by amino acid limitation
YPL239W	YAR1	2.45	3.58E-04	Cytoplasmic ankyrin-repeat containing protein of unknown function, proposed to link the processes of 40S ribosomal subunit biogenesis and adaptation to osmotic and oxidative stress; expression repressed by heat shock
YOL071W	EMI5	2.44	0.02	Non-essential protein of unknown function required for transcriptional induction of the early meiotic-specific transcription factor IME1, also required for sporulation
YBR221C	PDB1	2.43	0	E1 beta subunit of the pyruvate dehydrogenase (PDH) complex, which is an evolutionarily-conserved multi-protein complex found in mitochondria
YDR033W	MRH1	2.43	0	Protein that localizes primarily to the plasma membrane, also found at the nuclear envelope; has similarity to Hsp30p and Yro2p, which are induced during heat shock
YEL024W	RIP1	2.42	0	Ubiquinol-cytochrome-c reductase, a Rieske iron-sulfur protein of the mitochondrial cytochrome bc1 complex; transfers electrons from ubiquinol to cytochrome c1 during respiration
YLR008C	PAM18	2.42	0	Constituent of the mitochondrial import motor associated with the presequence translocase, along with Ssc1p, Tim44p, Mge1p, and Pam16p; stimulates the ATPase activity of Ssc1p to drive mitochondrial import; contains a J domain
YOR157C	PUP1	2.42	0.01	Endopeptidase with trypsin-like activity that cleaves after basic residues; beta-type subunit of 20S proteasome synthesized as a proprotein before being proteolytically processed for assembly into 20S particle; human homolog is subunit Z
YDR298C	ATP5	2.42	0.03	Subunit 5 of the stator stalk of mitochondrial F1F0 ATP synthase, which is a large, evolutionarily conserved enzyme complex required for ATP synthesis; homologous to bovine subunit OSCP (oligomycin sensitivity-conferring protein)
YKL196C	YKT6	2.41	0.02	Vesicle membrane protein (v-SNARE) with acyltransferase activity; involved in trafficking to and within the Golgi, endocytic trafficking to the vacuole, and vacuolar fusion; membrane localization due to prenylation at the carboxy-terminus
YAL005C	SSA1	2.39	0	ATPase involved in protein folding and nuclear localization signal (NLS)-directed nuclear transport; member of heat shock protein 70 (HSP70) family; forms a chaperone complex with Ydj1p; localized to the nucleus, cytoplasm, and cell wall
YNL131W	TOM22	2.39	0	Component of the TOM (translocase of outer membrane) complex responsible for initial import of mitochondrially directed proteins; acts as a receptor for precursor proteins and mediates interaction between the TOM and TIM complexes
YDR188W	CCT6	2.38	2.16E-04	Subunit of the cytosolic chaperonin Cct ring complex, related to Tcp1p, essential protein that is required for the assembly of actin and tubulins in vivo; contains an ATP-binding motif
YPR149W	NCE102	2.37	0.01	Protein of unknown function; contains transmembrane domains; involved in secretion of proteins that lack classical secretory signal sequences; component of the detergent-insoluble glycolipid-enriched complexes (DIGs)
YMR200W	ROT1	2.37	0.02	Essential ER membrane protein; may be involved in protein folding; mutation causes defects in cell wall synthesis and in lysis of autophagic bodies, suppresses tor2 mutations, and is synthetically lethal with kar2-1 and with rot2 mutations

YNL055C	POR1	2.36	0.01	Mitochondrial porin (voltage-dependent anion channel), outer membrane protein required for the maintenance of mitochondrial osmotic stability and mitochondrial membrane permeability
YLR286C	CTS1	2.35	2.08E-04	Endochitinase, required for cell separation after mitosis; transcriptional activation during late G and early M cell cycle phases is mediated by transcription factor Ace2p
YPR176C	BET2	2.35	0.02	Beta subunit of Type II geranylgeranyltransferase required for vesicular transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi; provides a membrane attachment moiety to Rab-like proteins Ypt1p and Sec4p
YDR345C	HXT3	2.34	0.01	Low affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily, expression is induced in low or high glucose conditions
YKL063C	YKL063C	2.33	0.05	Putative protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the Golgi
YGR037C	ACB1	2.32	0	Acyl-CoA-binding protein, transports newly synthesized acyl-CoA esters from fatty acid synthetase (Fas1p-Fas2p) to acyl-CoA-consuming processes
YGL002W	ERP6	2.32	0.01	Protein with similarity to Emp24p and Erv25p, member of the p24 family involved in ER to Golgi transport
YOR204W	DED1	2.32	0.01	ATP-dependent DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp)-box RNA helicase, required for translation initiation of all yeast mRNAs; mutations in human DEAD-box DBY are a frequent cause of male infertility
YKL013C	ARC19	2.32	0.02	Subunit of the ARP2/3 complex, which is required for the motility and integrity of cortical actin patches
YLR304C	ACO1	2.32	0.02	Aconitase, required for the tricarboxylic acid (TCA) cycle and also independently required for mitochondrial genome maintenance; component of the mitochondrial nucleoid; mutation leads to glutamate auxotrophy
YPL179W	PPQ1	2.32	0.03	Putative protein serine/threonine phosphatase; null mutation enhances efficiency of translational suppressors
YJL008C	CCT8	2.31	2.83E-04	Subunit of the cytosolic chaperonin Cct ring complex, related to Tcp1p, required for the assembly of actin and tubulins in vivo
YOR189W	IES4	2.31	0.04	Protein that associates with the INO80 chromatin remodeling complex under low-salt conditions
YNL096C	RPS7B	2.3	2.87E-04	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit, nearly identical to Rps7Ap; interacts with Kti11p; deletion causes hypersensitivity to zymocin; has similarity to rat S7 and Xenopus S8 ribosomal proteins
YOR226C	ISU2	2.28	0	Conserved protein of the mitochondrial matrix, required for synthesis of mitochondrial and cytosolic iron-sulfur proteins, performs a scaffolding function in mitochondria during Fe/S cluster assembly; isu1 isu2 double mutant is inviable
YPR073C	LTP1	2.28	0.02	Protein phosphotyrosine phosphatase of unknown cellular role; activated by adenine
YPR020W	ATP20	2.27	8.15E-04	Subunit g of the mitochondrial F1F0 ATP synthase, which is a large enzyme complex required for ATP synthesis; associated only with the dimeric form of ATP synthase
YGL037C	PNC1	2.27	0.01	Nicotinamidase that converts nicotinamide to nicotinic acid as part of the NAD(+) salvage pathway, required for life span extension by calorie restriction; PNC1 expression responds to all known stimuli that extend replicative life span
YIL021W	RPB3	2.27	0.01	RNA polymerase II third largest subunit B44, part of central core; similar to prokaryotic alpha subunit
YDR062W	LCB2	2.26	4.11E-04	Component of serine palmitoyltransferase, responsible along with Lcb1p for the first committed step in sphingolipid synthesis, which is the condensation of serine with palmitoyl-CoA to form 3-ketosphinganine
YLL041C	SDH2	2.26	0.03	Iron-sulfur protein subunit of succinate dehydrogenase (Sdh1p, Sdh2p, Sdh3p, Sdh4p), which couples the oxidation of succinate to the transfer of electrons to ubiquinone
YPL050C	MNN9	2.26	0.04	Subunit of Golgi mannosyltransferase complex also containing Anp1p, Mnn10p, Mnn11p, and Hoc1p that mediates elongation of the polysaccharide mannan backbone; forms a separate complex with Van1p that is also involved in backbone elongation
YJR016C	ILV3	2.25	0	Dihydroxyacid dehydratase, catalyzes third step in the common pathway leading to biosynthesis of branched-chain amino acids

YOR311C	HSD1	2.25	0.01	Endoplasmic reticulum (ER)-resident membrane protein, overproduction induces enlargement of ER-like membrane structures and suppresses a temperature-sensitive sly1 mutation
YKL163W	PIR3	2.25	0.04	O-glycosylated covalently-bound cell wall protein required for cell wall stability; expression is cell cycle regulated, peaking in M/G1 and also subject to regulation by the cell integrity pathway
YGL101W	YGL101W	2.24	4.52E-04	hypothetical protein
YNL085W	MKT1	2.24	0.01	Protein that forms a complex with Pbp1p that may mediate posttranscriptional regulation of HO endonuclease; involved in propagation of M2 dsRNA satellite of L-A virus
YDL046W	NPC2	2.24	0.03	Functional homolog of human NPC2/He1, which is a cholesterol-binding protein whose deficiency causes Niemann-Pick type C2 disease involving retention of cholesterol in lysosomes
YGL123W	RPS2	2.23	0.01	Protein component of the small (40S) subunit, essential for control of translational accuracy; has similarity to E. coli S5 and rat S2 ribosomal proteins
YNR037C	RSM19	2.23	0.04	Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit, has similarity to E. coli S19 ribosomal protein
YNL248C	RPA49	2.22	0	RNA polymerase I subunit A49
YGR033C	TIM21	2.22	0.02	Constituent of the mitochondrial inner membrane presequence translocase (TIM23 complex); may regulate protein import by binding to both the translocase of the outer membrane (TOM) and presequence-associated motor (PAM) complexes
YGR044C	RME1	2.21	0	Zinc finger protein involved in control of meiosis; prevents meiosis by repressing IME1 expression and promotes mitosis by activating CLN2 expression; directly repressed by a1-a2 regulator; mediates cell type control of sporulation
YLR359W	ADE13	2.21	0	Adenylosuccinate lyase, catalyzes two steps in the 'de novo' purine nucleotide biosynthetic pathway
YLR300W	EXG1	2.21	5.77E-04	Major exo-1,3-beta-glucanase of the cell wall, involved in cell wall beta-glucan assembly; exists as three differentially glycosylated isoenzymes
YMR099C	YMR099C	2.2	6.10E-04	Glucose-6-phosphate 1-epimerase (hexose-6-phosphate mutarotase), likely involved in carbohydrate metabolism; GFP-fusion protein localizes to the nucleus and cytoplasm; mutants show increased resistance to fluconazole
YER136W	GDI1	2.2	0.01	GDP dissociation inhibitor, regulates vesicle traffic in secretory pathways by regulating the dissociation of GDP from the Sec4/Ypt/rab family of GTP binding proteins
YKL077W	YKL077W	2.2	0.01	Putative protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the vacuole
YOL088C	MPD2	2.2	0.01	Member of the protein disulfide isomerase (PDI) family, exhibits chaperone activity; overexpression suppresses the lethality of a pdi1 deletion but does not complement all Pdi1p functions; undergoes oxidation by Ero1p
YER056C	FCY2	2.2	0.03	Purine-cytosine permease, mediates purine (adenine, guanine, and hypoxanthine) and cytosine accumulation
YGL242C	YGL242C	2.19	6.78E-04	Putative protein of unknown function; deletion mutant is viable
YIL116W	HIS5	2.19	0.02	Histidinol-phosphate aminotransferase, catalyzes the seventh step in histidine biosynthesis; responsive to general control of amino acid biosynthesis; mutations cause histidine auxotrophy and sensitivity to Cu, Co, and Ni salts
YGL100W	SEH1	2.19	0.05	Nuclear pore protein that is part of the evolutionarily conserved Nup84p complex (Nup84p, Nup85p, Nup120p, Nup145p, and Seh1p); homologous to Sec13p
YPR004C	YPR004C	2.18	0	Electron transfer flavoprotein complex subunit ETF-alpha; contains a FAD binding domain; interacts with YFH1, the yeast frataxin homolog
YOL092W	YOL092W	2.18	0.01	hypothetical protein
YGL076C	RPL7A	2.17	0	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit, nearly identical to Rpl7Bp and has similarity to E. coli L30 and rat L7 ribosomal proteins; contains a conserved C-terminal Nucleic acid Binding Domain (NDB2)
YLR370C	ARC18	2.17	0	Subunit of the ARP2/3 complex, which is required for the motility and integrity of cortical actin patches

YDR435C	PPM1	2.17	8.24E-04	Carboxyl methyl transferase, methylates the C terminus of the protein phosphatase 2A catalytic subunit (Pph21p or Pph22p), which is important for complex formation with regulatory subunits
YNL114C	YNL114C	2.17	9.70E-04	hypothetical protein; open reading frame extensively overlaps essential RPC19 gene encoding an RNA polymerase subunit
YER021W	RPN3	2.17	0.01	Essential, non-ATPase regulatory subunit of the 26S proteasome lid, similar to the p58 subunit of the human 26S proteasome; temperature-sensitive alleles cause metaphase arrest, suggesting a role for the proteasome in cell cycle control
YCR026C	NPP1	2.17	0.02	Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member; mediates extracellular nucleotide phosphate hydrolysis along with Npp2p and Pho5p; activity and expression enhanced during conditions of phosphate starvation
YLR354C	TAL1	2.17	0.03	Transaldolase, enzyme in the non-oxidative pentose phosphate pathway; converts sedoheptulose 7-phosphate and glyceraldehyde 3-phosphate to erythrose 4-phosphate and fructose 6-phosphate
YGL206C	CHC1	2.17	0.04	Clathrin heavy chain, subunit of the major coat protein involved in intracellular protein transport and endocytosis; two heavy chains form the clathrin triskelion structural component; the light chain (CLC1) is thought to regulate function
YKL068W	NUP100	2.16	0.05	Subunit of the nuclear pore complex (NPC) that is localized to both sides of the pore; contains a repetitive GLFG motif that interacts with mRNA export factor Mex67p and with karyopherin Kap95p; homologous to Nup116p
YGL011C	SCL1	2.15	0	Alpha subunit of the 20S core complex of the 26S proteasome involved in the degradation of ubiquitinated substrates; essential for growth; detected in the mitochondria
YMR235C	RNA1	2.15	8.74E-04	GTPase activating protein (GAP) for Gsp1p, involved in nuclear transport
YDR158W	HOM2	2.15	0.01	Aspartic beta semi-aldehyde dehydrogenase, catalyzes the second step in the common pathway for methionine and threonine biosynthesis; expression regulated by Gcn4p and the general control of amino acid synthesis
YAL038W	CDC19	2.14	0.01	Pyruvate kinase, functions as a homotetramer in glycolysis to convert phosphoenolpyruvate to pyruvate, the input for aerobic (TCA cycle) or anaerobic (glucose fermentation) respiration
YJL167W	ERG20	2.14	0.01	Farnesyl pyrophosphate synthetase, has both dimethylallyltransferase and geranyltransferase activities; catalyzes the formation of C15 farnesyl pyrophosphate units for isoprenoid and sterol biosynthesis
YMR058W	FET3	2.14	0.02	Ferro-O <sub>2</sub> -oxidoreductase required for high-affinity iron uptake and involved in mediating resistance to copper ion toxicity, belongs to class of integral membrane multicopper oxidases
YLR088W	GAA1	2.14	0.05	Subunit of the GPI (glycosylphosphatidylinositol):protein transamidase complex, removes the GPI-anchoring signal and attaches GPI to proteins in the ER
YGR175C	ERG1	2.13	0	Squalene epoxidase, catalyzes the epoxidation of squalene to 2,3-oxidosqualene; plays an essential role in the ergosterol-biosynthesis pathway and is the specific target of the antifungal drug terbinafine
YHR010W	RPL27A	2.13	0	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit, nearly identical to Rpl27Bp and has similarity to rat L27 ribosomal protein
YOR196C	LIP5	2.13	0.02	Protein involved in biosynthesis of the coenzyme lipoic acid, has similarity to E. coli lipoic acid synthase
YKL104C	GFA1	2.12	0	Glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase, catalyzes the formation of glucosamine-6-P and glutamate from fructose-6-P and glutamine in the first step of chitin biosynthesis
YDR035W	ARO3	2.12	0.02	3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate (DAHP) synthase, catalyzes the first step in aromatic amino acid biosynthesis and is feedback-inhibited by phenylalanine or high concentration of tyrosine or tryptophan
YNL090W	RHO2	2.12	0.05	Non-essential small GTPase of the Rho/Rac subfamily of Ras-like proteins, involved in the establishment of cell polarity and in microtubule assembly
YNR050C	LYS9	2.11	0	Saccharopine dehydrogenase (NADP <sup>+</sup> , L-glutamate-forming); catalyzes the formation of saccharopine from alpha-aminoadipate 6-semialdehyde, which is the seventh step in lysine biosynthesis

				pathway
YPR114W	YPR114W	2.11	0	hypothetical protein
YDR088C	SLU7	2.11	0.01	RNA splicing factor, required for ATP-independent portion of 2nd catalytic step of spliceosomal RNA splicing; interacts with Prp18p; contains zinc knuckle domain
YDR328C	SKP1	2.11	0.01	Evolutionarily conserved kinetochore protein that is part of multiple protein complexes, including the SCF ubiquitin ligase complex, the CBF3 complex that binds centromeric DNA, and the RAVE complex that regulates assembly of the V-ATPase
YGL140C	YGL140C	2.11	0.01	hypothetical protein
YOR150W	MRPL23	2.11	0.05	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
YNL037C	IDH1	2.1	0	Subunit of mitochondrial NAD(+)-dependent isocitrate dehydrogenase, which catalyzes the oxidation of isocitrate to alpha-ketoglutarate in the TCA cycle
YOR061W	CKA2	2.1	0	Alpha' catalytic subunit of casein kinase 2, a Ser/Thr protein kinase with roles in cell growth and proliferation; the holoenzyme also contains CKA1, CKB1 and CKB2, the many substrates include transcription factors and all RNA polymerases
YOR128C	ADE2	2.1	0.02	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, catalyzes a step in the 'de novo' purine nucleotide biosynthetic pathway; red pigment accumulates in mutant cells deprived of adenine
YKL190W	CNB1	2.1	0.03	Calcineurin B; the regulatory subunit of calcineurin, a Ca <sup>++</sup> /calmodulin-regulated protein phosphatase which regulates Crz1p (a stress-response transcription factor), the other calcineurin subunit is encoded by CNA1 and/or CMP1
YBR046C	ZTA1	2.1	0.04	Zeta-crystallin homolog, found in the cytoplasm and nucleus; has similarity to E. coli quinone oxidoreductase and to human zeta-crystallin, which has quinone oxidoreductase activity
YOR283W	YOR283W	2.1	0.04	hypothetical protein
YKL178C	STE3	2.09	0.01	Receptor for a factor receptor, transcribed in alpha cells and required for mating by alpha cells, couples to MAP kinase cascade to mediate pheromone response; ligand bound receptors are endocytosed and recycled to the plasma membrane; GPCR
YBR159W	IFA38	2.09	0.02	Microsomal beta-keto-reductase; contains oleate response element (ORE) sequence in the promoter region; mutants exhibit reduced VLCFA synthesis, accumulate high levels of dihydrosphingosine, phytosphingosine and medium-chain ceramides.
YGL255W	ZRT1	2.09	0.03	High-affinity zinc transporter of the plasma membrane, responsible for the majority of zinc uptake; transcription is induced under low-zinc conditions by the Zap1p transcription factor
YLR048W	RPS0B	2.09	0.03	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit, nearly identical to Rps0Ap; required for maturation of 18S rRNA along with Rps0Ap; deletion of either RPS0 gene reduces growth rate, deletion of both genes is lethal
YMR096W	SNZ1	2.09	0.03	Protein involved in vitamin B6 biosynthesis; member of a stationary phase-induced gene family; coregulated with SNO1; interacts with Sno1p and with Yhr198p, perhaps as a multiprotein complex containing other Snz and Sno proteins
YGL253W	HXK2	2.09	0.05	Hexokinase isoenzyme 2 that catalyzes phosphorylation of glucose in the cytosol; predominant hexokinase during growth on glucose; functions in the nucleus to repress expression of HXK1 and GLK1 and to induce expression of its own gene
YJL024C	APS3	2.08	0	Small subunit of the clathrin-associated adaptor complex AP-3, which is involved in vacuolar protein sorting; related to the sigma subunit of the mammalian clathrin AP-3 complex; suppressor of loss of casein kinase 1 function
YDR343C	HXT6	2.08	0.01	High-affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily, nearly identical to Hxt7p, expressed at high basal levels relative to other HXTs, repression of expression by high glucose requires SNF3
YDR245W	MNN10	2.08	0.02	Subunit of a Golgi mannosyltransferase complex also containing Anp1p, Mnn9p, Mnn11p, and Hoc1p that mediates elongation of the polysaccharide mannan backbone; membrane protein of the mannosyltransferase family
YDR275W	BSC2	2.08	0.03	Protein of unknown function, ORF exhibits genomic organization compatible with a translational readthrough-dependent mode of

				expression
YPL178W	CBC2	2.08	0.03	Small subunit of the heterodimeric cap binding complex that also contains Sto1p, component of the spliceosomal commitment complex; interacts with Npl3p, possibly to package mRNA for export from the nucleus; contains an RNA-binding motif
YGR020C	VMA7	2.08	0.04	Subunit F of the eight-subunit V1 peripheral membrane domain of vacuolar H <sup>+</sup> -ATPase (V-ATPase), an electrogenic proton pump found throughout the endomembrane system; required for the V1 domain to assemble onto the vacuolar membrane
YDL212W	SHR3	2.07	0	Endoplasmic reticulum packaging chaperone, required for incorporation of amino acid permeases into COPII coated vesicles for transport to the cell surface
YKL003C	MRP17	2.07	0	Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit; MRP17 exhibits genetic interactions with PET122, encoding a COX3-specific translational activator
YLR421C	RPN13	2.07	0	Subunit of the 19S regulatory particle of the 26S proteasome lid
YJL003W	COX16	2.07	0.01	Mitochondrial inner membrane protein, required for assembly of cytochrome c oxidase
YMR243C	ZRC1	2.07	0.03	Vacuolar membrane zinc transporter, transports zinc from the cytosol into the vacuole for storage; also has a role in resistance to zinc shock resulting from a sudden influx of zinc into the cytoplasm
YBR043C	QDR3	2.06	0.01	Multidrug transporter required for resistance to quinidine, barban, cisplatin, and bleomycin; member of the major facilitator superfamily of transporters conferring multiple drug resistance (MFS-MDR)
YFR055W	IRC7	2.06	0.01	Putative cystathionine beta-lyase; involved in copper ion homeostasis and sulfur metabolism; null mutant displays increased levels of spontaneous Rad52 foci
YHR064C	SSZ1	2.06	0.02	Hsp70 protein that interacts with Zuo1p (a DnaJ homolog) to form a ribosome-associated complex that binds the ribosome via the Zuo1p subunit; also involved in pleiotropic drug resistance via sequential activation of PDR1 and PDR5; binds ATP
YBR053C	YBR053C	2.05	0	hypothetical protein
YMR031C	YMR031C	2.05	0.01	Putative protein of unknown function with similarity to YKL050C and USO1/YDL058W; found in mitochondria; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm; YMR031C is not an essential gene
YGL148W	ARO2	2.05	0.04	Bifunctional chorismate synthase and flavin reductase, catalyzes the conversion of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate (EPSP) to form chorismate, which is a precursor to aromatic amino acids
YHR092C	HXT4	2.05	0.04	High-affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily, expression is induced by low levels of glucose and repressed by high levels of glucose
YHR183W	GND1	2.04	0	6-phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating), catalyzes an NADPH regenerating reaction in the pentose phosphate pathway; required for growth on D-glucono-delta-lactone and adaptation to oxidative stress
YHR018C	ARG4	2.04	0.01	Argininosuccinate lyase, catalyzes the final step in the arginine biosynthesis pathway
YGR282C	BGL2	2.04	0.03	Endo-beta-1,3-glucanase, major protein of the cell wall, involved in cell wall maintenance
YOR093C	YOR093C	2.04	0.03	hypothetical protein
YLR262C	YPT6	2.04	0.05	GTPase, Ras-like GTP binding protein involved in the secretory pathway, required for fusion of endosome-derived vesicles with the late Golgi, maturation of the vacuolar carboxypeptidase Y; has similarity to the human GTPase, Rab6
YCR012W	PGK1	2.03	0	3-phosphoglycerate kinase, catalyzes transfer of high-energy phosphoryl groups from the acyl phosphate of 1,3-bisphosphoglycerate to ADP to produce ATP; key enzyme in glycolysis and gluconeogenesis
YGR220C	MRPL9	2.03	0.01	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
YOR198C	BFR1	2.03	0.01	Component of mRNP complexes associated with polyribosomes; implicated in secretion and nuclear segregation; multicopy suppressor of BFA (Brefeldin A) sensitivity
YOR331C	YOR331C	2.03	0.01	hypothetical protein

YPL198W	RPL7B	2.03	0.01	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit, nearly identical to Rpl7Ap and has similarity to E. coli L30 and rat L7 ribosomal proteins; contains a conserved C-terminal Nucleic acid Binding Domain (NDB2)
YNL155W	YNL155W	2.02	0.01	hypothetical protein
YLR170C	APS1	2.02	0.03	Small subunit of the clathrin-associated adaptor complex AP-1, which is involved in protein sorting at the trans-Golgi network; homolog of the sigma subunit of the mammalian clathrin AP-1 complex
YDL002C	NHP10	2.02	0.05	Protein related to mammalian high mobility group proteins; likely component of the INO80 complex, which is an ATP-dependent chromatin-remodeling complex
YER073W	ALD5	2.01	0.03	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase, involved in regulation or biosynthesis of electron transport chain components and acetate formation; activated by K <sup>+</sup> ; utilizes NADP <sup>+</sup> as the preferred coenzyme; constitutively expressed
YER174C	GRX4	2	0	Hydroperoxide and superoxide-radical responsive glutathione-dependent oxidoreductase; monothiol glutaredoxin subfamily member along with Grx3p and Grx5p; protects cells from oxidative damage
YGR254W	ENO1	2	0	Enolase I, a phosphopyruvate hydratase that catalyzes the conversion of 2-phosphoglycerate to phosphoenolpyruvate during glycolysis and the reverse reaction during gluconeogenesis; expression is repressed in response to glucose
YGR035C	YGR035C	2	0.01	Putative protein of unknown function, potential Cdc28p substrate; transcription is activated by paralogous transcription factors Yrm1p and Yrr1p along with genes involved in multidrug resistance
YGR132C	PHB1	2	0.01	Subunit of the prohibitin complex (Phb1p-Phb2p), a 1.2 MDa ring-shaped inner mitochondrial membrane chaperone that stabilizes newly synthesized proteins; determinant of replicative life span; involved in mitochondrial segregation
YIR012W	SQT1	2	0.01	Essential protein involved in a late step of 60S ribosomal subunit assembly or modification; contains multiple WD repeats; interacts with Qsr1p in a two-hybrid assay
YGR026W	YGR026W	2	0.02	Putative protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cell periphery
YER120W	SCS2	1.99	0	Integral ER membrane protein that regulates phospholipid metabolism via an interaction with the FFAT motif of Opi1p, also involved in telomeric silencing, disruption causes inositol auxotrophy above 34 degrees C, VAP homolog
YJL056C	ZAP1	1.99	0	Zinc-regulated transcription factor, binds to zinc-responsive promoter elements to induce transcription of certain genes in the presence of zinc; regulates its own transcription; contains seven zinc-finger domains
YNL100W	YNL100W	1.99	0	Putative protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to mitochondria; YNL100W is not an essential gene
YOR374W	ALD4	1.99	0	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase, required for growth on ethanol and conversion of acetaldehyde to acetate; activity is K <sup>+</sup> dependent; utilizes NADP <sup>+</sup> or NAD <sup>+</sup> equally as coenzymes; expression is glucose repressed
YJL053W	PEP8	1.99	0.01	Vacuolar protein sorting protein that forms part of the multimeric membrane-associated retromer complex along with Vps35p, Vps29p, Vps17p, and Vps5p; essential for endosome-to-Golgi retrograde protein transport
YGR137W	YGR137W	1.99	0.03	hypothetical protein
YNR061C	YNR061C	1.99	0.03	hypothetical protein
YMR193C-A	YMR193C-A	1.99	0.04	hypothetical protein
YIL043C	CBR1	1.98	0	Microsomal cytochrome b reductase, not essential for viability; also detected in mitochondria
YJL124C	LSM1	1.98	0	Lsm (Like Sm) protein; forms heteroheptameric complex (with Lsm2p, Lsm3p, Lsm4p, Lsm5p, Lsm6p, and Lsm7p) involved in degradation of cytoplasmic mRNAs
YML048W	GSF2	1.98	0.01	ER localized integral membrane protein that may promote secretion of certain hexose transporters, including Gal2p; involved in glucose-dependent repression

YER065C	ICL1	1.98	0.02	Isocitrate lyase, catalyzes the formation of succinate and glyoxylate from isocitrate, a key reaction of the glyoxylate cycle; expression of ICL1 is induced by growth on ethanol and repressed by growth on glucose
YLR357W	RSC2	1.98	0.03	One of 15 subunits of the 'Remodel the Structure of Chromatin' (RSC) complex; required for expression of mid-late sporulation-specific genes; involved in telomere maintenance
YML092C	PRE8	1.98	0.03	20S proteasome beta-type subunit
YPL159C	PET20	1.98	0.04	Protein required for respiratory growth and stability of the mitochondrial genome
YOL154W	ZPS1	1.98	0.05	Putative GPI-anchored protein; transcription is induced under low-zinc conditions, as mediated by the Zap1p transcription factor, and at alkaline pH
YDR050C	TPI1	1.97	0	Triose phosphate isomerase, abundant glycolytic enzyme; mRNA half-life is regulated by iron availability; transcription is controlled by activators Reb1p, Gcr1p, and Rap1p through binding sites in the 5' non-coding region
YOL010W	RCL1	1.97	0.01	RNA terminal phosphate cyclase-like protein involved in rRNA processing at sites A0, A1, and A2; does not possess detectable RNA cyclase activity
YDR002W	YRB1	1.96	0	Ran GTPase binding protein; involved in nuclear protein import and RNA export, ubiquitin-mediated protein degradation during the cell cycle; shuttles between the nucleus and cytoplasm; is essential; homolog of human RanBP1
YLR285W	NNT1	1.96	0.01	Putative nicotinamide N-methyltransferase, has a role in rDNA silencing and in lifespan determination
YMR002W	MIC17	1.96	0.03	Putative protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the nucleus and cytoplasm; YMR002W is not an essential gene
YDL236W	PHO13	1.96	0.05	Alkaline phosphatase specific for p-nitrophenyl phosphate, involved in dephosphorylation of histone II-A and casein
YDR397C	NCB2	1.95	0	Beta subunit of the NC2 dimeric histone-fold complex; represses RNA polymerase II transcription through binding to TBP and inhibition of TFIIA and TFIIB; homologous to the Dr1 subunit of the mammalian NC2 (negative cofactor2)
YDR497C	ITR1	1.95	0	Myo-inositol transporter with strong similarity to the minor myo-inositol transporter Itr2p, member of the sugar transporter superfamily; expression is repressed by inositol and choline via Opi1p and derepressed via Ino2p and Ino4p
YPL036W	PMA2	1.95	0	Plasma membrane H <sup>+</sup> -ATPase, isoform of Pma1p, involved in pumping protons out of the cell; regulator of cytoplasmic pH and plasma membrane potential
YOR335C	ALA1	1.95	0.01	Cytoplasmic alanyl-tRNA synthetase, required for protein synthesis; point mutation (cdc64-1 allele) causes cell cycle arrest at G1; lethality of null mutation is functionally complemented by human homolog
YGR181W	TIM13	1.94	0.02	Mitochondrial intermembrane space protein, forms a complex with Tim8p that mediates import and insertion of a subset of polytopic inner membrane proteins; may prevent aggregation of incoming proteins in a chaperone-like manner
YDR041W	RSM10	1.94	0.04	Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit, has similarity to E. coli S10 ribosomal protein; essential for viability, unlike most other mitoribosomal proteins
YFL032W	YFL032W	1.94	0.04	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein, based on available experimental and comparative sequence data; partially overlaps the verified gene HAC1/YFL031W; YFL032W is not an essential gene
YJL001W	PRE3	1.93	0	20S proteasome beta-type subunit, responsible for cleavage after acidic residues in peptides
YMR038C	CCS1	1.93	0	Copper chaperone for superoxide dismutase Sod1p, involved in oxidative stress protection; Met-X-Cys-X2-Cys motif within the N-terminal portion is involved in insertion of copper into Sod1p under conditions of copper deprivation
YOL061W	PRS5	1.93	0	5-phospho-ribosyl-1(alpha)-pyrophosphate synthetase, involved in nucleotide, histidine, and tryptophan biosynthesis; one of a five related enzymes, which are active as heteromultimeric complexes

YDR342C	HXT7	1.93	0.01	High-affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily, nearly identical to Hxt6p, expressed at high basal levels relative to other HXTs, expression repressed by high glucose levels
YKL120W	OAC1	1.93	0.02	Mitochondrial inner membrane transporter, transports oxaloacetate, sulfate, and thiosulfate; member of the mitochondrial carrier family
YOR176W	HEM15	1.93	0.02	Ferrochelatase, a mitochondrial inner membrane protein, catalyzes the insertion of ferrous iron into protoporphyrin IX, the eighth and final step in the heme biosynthetic pathway; Yfh1p mediates the use of iron by Hem15p
YDL053C	PBP4	1.93	0.04	Pbp1p binding protein, interacts strongly with Pab1p-binding protein 1 (Pbp1p) in the yeast two-hybrid system; also interacts with Lsm12p in a copurification assay
YBR205W	KTR3	1.93	0.05	Putative alpha-1,2-mannosyltransferase involved in O- and N-linked protein glycosylation; member of the KRE2/MNT1 mannosyltransferase family
YDR361C	BCP1	1.93	0.05	Essential protein involved in nuclear export of Mss4p, which is a lipid kinase that generates phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and plays a role in actin cytoskeleton organization and vesicular transport
YFL038C	YPT1	1.92	0	Ras-like small GTPase, involved in the ER-to-Golgi step of the secretory pathway; complex formation with the Rab escort protein Mrs6p is required for prenylation of Ypt1p by protein geranylgeranyltransferase type II (Bet2p-Bet4p)
YPR074C	TKL1	1.92	0.01	Transketolase, similar to Tkl2p; catalyzes conversion of xylulose-5-phosphate and ribose-5-phosphate to sedoheptulose-7-phosphate and glyceraldehyde-3-phosphate in the pentose phosphate pathway; needed for synthesis of aromatic amino acids
YDR049W	YDR049W	1.92	0.05	hypothetical protein
YNL252C	MRPL17	1.91	0.02	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
YOR247W	SRL1	1.91	0.04	Mannoprotein that exhibits a tight association with the cell wall, required for cell wall stability in the absence of GPI-anchored mannoproteins; has a high serine-threonine content; expression is induced in cell wall mutants
YPL112C	PEX25	1.91	0.04	Peripheral peroxisomal membrane peroxin required for the regulation of peroxisome size and maintenance, recruits GTPase Rho1p to peroxisomes, induced by oleate, interacts with homologous protein Pex27p
YBR149W	ARA1	1.9	0.02	Large subunit of NADP <sup>+</sup> dependent arabinose dehydrogenase, involved in carbohydrate metabolism; small subunit is unidentified
YMR105C	PGM2	1.9	0.03	Phosphoglucomutase, catalyzes the conversion from glucose-1-phosphate to glucose-6-phosphate, which is a key step in hexose metabolism; functions as the acceptor for a Glc-phosphotransferase
YNL220W	ADE12	1.9	0.04	Adenylosuccinate synthase, catalyzes the first committed step in the 'de novo' biosynthesis of adenosine
YGL121C	GPG1	1.9	0.05	Proposed gamma subunit of the heterotrimeric G protein that interacts with the receptor Grp1p; involved in regulation of pseudohyphal growth; requires Gpb1p or Gpb2p to interact with Gpa2p
YMR022W	QRI8	1.9	0.05	Ubiquitin conjugating enzyme, involved in the ER-associated protein degradation pathway; requires Cue1p for recruitment to the ER membrane; proposed to be involved in chromatin assembly
YGL234W	ADE5,7	1.89	0.01	Bifunctional enzyme of the 'de novo' purine nucleotide biosynthetic pathway, contains aminoimidazole ribotide synthetase and glycinamide ribotide synthetase activities
YLL027W	ISA1	1.89	0.01	Mitochondrial matrix protein involved in biogenesis of the iron-sulfur (Fe/S) cluster of Fe/S proteins, isa1 deletion causes loss of mitochondrial DNA and respiratory deficiency; depletion reduces growth on nonfermentable carbon sources
YNL153C	GIM3	1.89	0.01	Subunit of the heterohexameric cochaperone prefoldin complex which binds specifically to cytosolic chaperonin and transfers target proteins to it
YLR120C	YPS1	1.89	0.02	Aspartic protease, attached to the plasma membrane via a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor
YLR208W	SEC13	1.89	0.02	Component of both the Nup84 nuclear pore sub-complex and of the COPII complex (Sar1p, Sec13p, Sec16p, Sec23p, Sec24p, Sec31p, Sfb2p, and Sfb3p) which is important for the formation of ER to Golgi transport vesicles
YPL107W	YPL107W	1.89	0.05	hypothetical protein

YIL133C	RPL16A	1.88	0.01	N-terminally acetylated protein component of the large (60S) ribosomal subunit, binds to 5.8 S rRNA; has similarity to Rpl16Bp, E. coli L13 and rat L13a ribosomal proteins; transcriptionally regulated by Rap1p
YOR304C-A	YOR304C-A	1.88	0.01	Protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cell periphery, cytoplasm, bud, and bud neck
YOR367W	SCP1	1.88	0.01	Component of yeast cortical actin cytoskeleton, binds and cross links actin filaments; originally identified by its homology to calponin (contains a calponin-like repeat) but the Scp1p domain structure is more similar to transgelin
YKL175W	ZRT3	1.88	0.02	Vacuolar membrane zinc transporter, transports zinc from storage in the vacuole to the cytoplasm when needed; transcription is induced under conditions of zinc deficiency
YLR044C	PDC1	1.87	0.01	Major of three pyruvate decarboxylase isozymes, key enzyme in alcoholic fermentation, decarboxylates pyruvate to acetaldehyde; subject to glucose-, ethanol-, and autoregulation; involved in amino acid catabolism
YNL030W	HHF2	1.87	0.01	One of two identical histone H4 proteins (see also HHF1); core histone required for chromatin assembly and chromosome function; contributes to telomeric silencing; N-terminal domain involved in maintaining genomic integrity
YDL111C	RRP42	1.87	0.03	Protein involved in rRNA processing; component of the exosome 3->5 exonuclease complex with Rrp4p, Rrp41p, Rrp43p and Dis3p
YHR203C	RPS4B	1.87	0.03	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit; identical to Rps4Ap and has similarity to rat S4 ribosomal protein
YGR189C	CRH1	1.87	0.04	Putative glycosidase of the cell wall, may have a role in cell wall architecture
YHR133C	NSG1	1.86	0.01	Protein involved in regulation of sterol biosynthesis; specifically stabilizes Hmg2p, one of two HMG-CoA isoenzymes that catalyze the rate-limiting step in sterol biosynthesis; homolog of mammalian INSIG proteins
YOR340C	RPA43	1.86	0.01	RNA polymerase I subunit A43
YPR032W	SRO7	1.86	0.01	Putative effector of Rab GTPase Sec4p, forms a complex with Sec4p and t-SNARE Sec9p; involved in exocytosis and docking and fusion of post-Golgi vesicles with plasma membrane; homolog of Sro77p and Drosophila lgl tumor suppressor
YPL011C	TAF3	1.86	0.03	TFIID subunit (47 kDa), involved in promoter binding and RNA polymerase II transcription initiation
YJL174W	KRE9	1.86	0.05	Glycoprotein involved in cell wall beta-glucan assembly; null mutation leads to severe growth defects, aberrant multibudded morphology, and mating defects
YPR082C	DIB1	1.86	0.05	17-kDa component of the U4/U6aU5 tri-snRNP, plays an essential role in pre-mRNA splicing, orthologue of the human U5-specific 15-kDa protein
YOL059W	GPD2	1.85	0.01	NAD-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase, homolog of Gpd1p, expression is controlled by an oxygen-independent signaling pathway required to regulate metabolism under anoxic conditions; located in cytosol and mitochondria
YGL246C	RAI1	1.85	0.02	Nuclear protein that binds to and stabilizes the exoribonuclease Rat1p, required for pre-rRNA processing
YHR094C	HXT1	1.85	0.02	Low-affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily, expression is induced by Hxk2p in the presence of glucose and repressed by Rgt1p when glucose is limiting
YFL018C	LPD1	1.85	0.03	Dihydrolipoamide dehydrogenase, the lipoamide dehydrogenase component (E3) of the pyruvate dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase multi-enzyme complexes
YGL043W	DST1	1.85	0.04	General transcription elongation factor TFIIS, enables RNA polymerase II to read through blocks to elongation by stimulating cleavage of nascent transcripts stalled at transcription arrest sites
YKL058W	TOA2	1.85	0.04	TFIIA small subunit; involved in transcriptional activation, acts as antirepressor or as coactivator; homologous to smallest subunit of human and Drosophila TFIIA
YDR419W	RAD30	1.84	0.01	DNA polymerase eta, involved in the predominantly error-free bypass replication of DNA lesions, catalyzes the efficient and accurate synthesis of DNA opposite cyclobutane pyrimidine dimers; homolog of human POLH and bacterial DinB proteins

YLR299W	ECM38	1.84	0.01	Gamma-glutamyltranspeptidase, major glutathione-degrading enzyme; expression induced mainly by nitrogen starvation
YOR232W	MGE1	1.84	0.01	Protein of the mitochondrial matrix involved in protein import into mitochondria; acts as a cochaperone and a nucleotide release factor for Ssc1p; homolog of E. coli GrpE
YPL028W	ERG10	1.84	0.01	Acetyl-CoA C-acetyltransferase (acetoacetyl-CoA thiolase), cytosolic enzyme that transfers an acetyl group from one acetyl-CoA molecule to another, forming acetoacetyl-CoA; involved in the first step in mevalonate biosynthesis
YMR108W	ILV2	1.84	0.02	Acetolactate synthase, catalyses the first common step in isoleucine and valine biosynthesis and is the target of several classes of inhibitors, localizes to the mitochondria; expression of the gene is under general amino acid control
YOR044W	YOR044W	1.84	0.02	hypothetical protein
YPL098C	MGR2	1.84	0.03	Protein required for growth of cells lacking the mitochondrial genome
YNL065W	AQR1	1.84	0.04	Plasma membrane transporter of the major facilitator superfamily that confers resistance to short-chain monocarboxylic acids and quinidine
YNL098C	RAS2	1.83	0.01	GTP-binding protein that regulates the nitrogen starvation response, sporulation, and filamentous growth; farnesylation and palmitoylation required for activity and localization to plasma membrane; homolog of mammalian Ras proto-oncogenes
YDL143W	CCT4	1.83	0.02	Subunit of the cytosolic chaperonin Cct ring complex, related to Tcp1p, required for the assembly of actin and tubulins in vivo
YOR187W	TUF1	1.83	0.03	Mitochondrial translation elongation factor Tu; comprises both GTPase and guanine nucleotide exchange factor activities, while these activities are found in separate proteins in S. pombe and humans
YNL138W	SRV2	1.83	0.04	CAP (cyclase-associated protein) subunit of adenylyl cyclase complex; N-terminus binds adenylyl cyclase and facilitates activation by RAS; C-terminus binds ADP-actin monomers, facilitating regulation of actin dynamics and cell morphogenesis
YDR074W	TPS2	1.82	0.01	Phosphatase subunit of the trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex, which synthesizes the storage carbohydrate trehalose; expression is induced by stress conditions and repressed by the Ras-cAMP pathway
YLR221C	RSA3	1.82	0.01	Protein with a likely role in ribosomal maturation, required for accumulation of wild-type levels of large (60S) ribosomal subunits; binds to the helicase Dbp6p in pre-60S ribosomal particles in the nucleolus
YDR384C	ATO3	1.82	0.02	Plasma membrane protein, regulation pattern suggests a possible role in export of ammonia from the cell; member of the TC 9.B.33 YaaH family of putative transporters
YIL124W	AYR1	1.82	0.02	NADPH-dependent 1-acyl dihydroxyacetone phosphate reductase found in lipid particles, ER, and mitochondrial outer membrane; involved in phosphatidic acid biosynthesis; required for spore germination; capable of metabolizing steroid hormones
YLR126C	YLR126C	1.82	0.02	Putative protein of unknown function with similarity to glutamine amidotransferase proteins; has Aft1p-binding motif in the promoter; may be involved in copper and iron homeostasis; YLR126C is not an essential protein
YNL185C	MRPL19	1.82	0.04	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
YMR035W	IMP2	1.81	0.03	Catalytic subunit of the mitochondrial inner membrane peptidase complex, required for maturation of mitochondrial proteins of the intermembrane space; complex contains Imp1p and Imp2p (both catalytic subunits), and Som1p
YPL244C	HUT1	1.81	0.04	Protein with a role in UDP-galactose transport to the Golgi lumen, has similarity to human UDP-galactose transporter UGTrel1, exhibits a genetic interaction with S. cerevisiae ERO1
YDR378C	LSM6	1.8	0.01	Lsm (Like Sm) protein; part of heteroheptameric complexes (Lsm2p-7p and either Lsm1p or 8p): cytoplasmic Lsm1p complex involved in mRNA decay; nuclear Lsm8p complex part of U6 snRNP and possibly involved in processing tRNA, snoRNA, and rRNA
YKL060C	FBA1	1.8	0.01	Fructose 1,6-bisphosphate aldolase, a cytosolic enzyme required for glycolysis and gluconeogenesis; catalyzes the conversion of fructose 1,6 bisphosphate into two 3-carbon products: glyceraldehyde-3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate

---

YMR266W	RSN1	1.8	0.01	Membrane protein of unknown function; overexpression suppresses NaCl sensitivity of <i>sro7</i> mutant
YPL078C	ATP4	1.8	0.01	Subunit b of the stator stalk of mitochondrial F1F0 ATP synthase, which is a large, evolutionarily conserved enzyme complex required for ATP synthesis
YLR020C	YEH2	1.8	0.05	Steryl ester hydrolase, catalyzes steryl ester hydrolysis at the plasma membrane; involved in sterol metabolism

**Tabella B. Geni di *Saccharomyces cerevisiae* down-regolati da Top1 Wt.**

Gene	Common Name	Fold Change	P-value	Description
YFL067W	YFL067W	-10.08	2.47E-09	hypothetical protein
YFL063W	YFL063W	-9.7	9.86E-10	Dubious open reading frame, based on available experimental and comparative sequence data
YAL069W	YAL069W	-8.81	0	hypothetical protein
YLR463C	YLR463C	-8.8	2.01E-07	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein, based on available experimental and comparative sequence data; overlaps the uncharacterized ORFs YLR462W and YLR464W
YDR543C	YDR543C	-7.5	3.42E-05	hypothetical protein
YLL065W	YLL065W	-7.26	4.64E-08	growth inhibitor
YNL337W	YNL337W	-7.15	1.98E-05	hypothetical protein
YBL111C	YBL111C	-7.04	8.74E-05	hypothetical protein
YIL060W	YIL060W	-6.99	1.04E-05	Putative protein of unknown function; mutant accumulates less glycogen than does wild type; YIL060W is not an essential gene
YEL076C	YEL076C	-6.91	5.47E-07	hypothetical protein
YEL076W-C	YEL076W-C	-6.62	0.01	hypothetical protein
YHR219W	YHR219W	-6.41	0	Putative protein of unknown function with similarity to helicases; located in the telomere region on the right arm of chromosome VIII
YPR203W	YPR203W	-6.41	0	hypothetical protein
YMR326C	YMR326C	-6.4	1.22E-04	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein, based on available experimental and comparative sequence data; overlaps the telomere on the right arm of chromosome 13
YDR366C	YDR366C	-6.39	6.84E-07	hypothetical protein
YEL074W	YEL074W	-6.36	0	hypothetical protein
YEL077C	YEL077C	-6.25	0	hypothetical protein
YPR202W	YPR202W	-6.07	3.89E-07	similar to other subtelomerically-encoded proteins
YLR465C	YLR465C	-6.01	0	Dubious open reading frame, unlikely to encode a protein; not conserved in closely related <i>Saccharomyces</i> species; 100% of YLR465C overlaps the uncharacterized ORF YLR464W and 86% of YLR465C overlaps the verified gene YRF1-4
YPR204W	YPR204W	-5.93	0.01	subtelomerically-encoded DNA helicase
YLR464W	YLR464W	-5.92	0	Putative protein of unknown function with similarity to helicases; YLR464W contains an intron and overlaps the verified gene YRF1-4/YLR466W and two dubious ORFs YLR463C and YLR465C
YNR077C	YNR077C	-5.84	0	hypothetical protein
YJR115W	YJR115W	-5.74	0.02	Putative protein of unknown function
YHR213W	YHR213W	-5.7	0	hypothetical protein
YHR218W	YHR218W	-5.69	1.53E-06	hypothetical protein
YHL050C	YHL050C	-5.67	3.89E-05	Putative protein of unknown function, potential Cdc28p substrate
YJR162C	YJR162C	-5.5	0.01	hypothetical protein
YKL225W	YKL225W	-5.49	0.03	hypothetical protein
YML133C	YML133C	-5.47	0	Putative protein of unknown function with similarity to helicases; localized to mitochondria; YML133C contains an intron
YHR145C	YHR145C	-5.42	0.03	hypothetical protein
YOL106W	YOL106W	-5.3	0	hypothetical protein
YLR462W	YLR462W	-5.22	2.82E-06	Putative protein of unknown function with similarity to helicases; YLR462W is within the telomere on the right arm of chromosome XII
YFL068W	YFL068W	-5.19	3.94E-06	hypothetical protein
YFL064C	YFL064C	-5.07	0	Putative protein of unknown function
YNL339C	YRF1-6	-5.03	6.11E-11	Helicase encoded by the Y' element of subtelomeric regions, highly expressed in the mutants lacking the telomerase component TLC1; potentially phosphorylated by Cdc28p
YFL066C	YFL066C	-4.97	0	Putative protein of unknown function
YLR334C	YLR334C	-4.87	2.06E-04	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein, based on available experimental and comparative sequence data; overlaps a stand-alone long terminal repeat sequence whose presence indicates a

				retrotransposition event occurred here
YFL058W	THI5	-4.71	1.55E-07	Protein involved in synthesis of the thiamine precursor hydroxymethylpyrimidine (HMP); member of a subtelomeric gene family including THI5, THI11, THI12, and THI13
YFL065C	YFL065C	-4.64	4.43E-05	Putative protein of unknown function
YHL049C	YHL049C	-4.46	8.35E-11	hypothetical protein
YAR062W	YAR062W	-4.28	0	hypothetical protein
YBL112C	YBL112C	-4.26	1.73E-05	Putative protein of unknown function; YBL112C is contained within TEL02L
YFL041W	FET5	-3.97	1.37E-07	Multicopper oxidase, integral membrane protein with similarity to Fet3p; may have a role in iron transport
YDR340W	YDR340W	-3.91	0	Putative protein of unknown function
YEL075C	YEL075C	-3.83	0	hypothetical protein
YPL238C	YPL238C	-3.55	0.03	hypothetical protein; open reading frame overlaps 5' end of essential SUI3 gene encoding a translation initiation factor subunit
YFL052W	YFL052W	-3.5	0	Putative zinc cluster protein that contains a DNA binding domain; null mutant sensitive to calcofluor white, low osmolarity and heat, suggesting a role for YFL052Wp in cell wall integrity
YJL223C	PAU1	-3.46	0	Part of 23-member seripauperin multigene family encoded mainly in subtelomeric regions, active during alcoholic fermentation, regulated by anaerobiosis, negatively regulated by oxygen, repressed by heme
YCL069W	VBA3	-3.36	1.84E-05	Permease of basic amino acids in the vacuolar membrane
YNR072W	HXT17	-3.32	5.44E-04	Protein of unknown function with similarity to hexose transporter family members, expression is repressed by high levels of glucose
YAL068C	PAU8	-3.2	3.99E-05	hypothetical protein
YCR068W	ATG15	-3.16	0.01	Lipase, required for intravacuolar lysis of autophagic bodies; located in the endoplasmic reticulum membrane and targeted to intravacuolar vesicles during autophagy via the multivesicular body (MVB) pathway
YJL220W	YJL220W	-3.15	0	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein, based on available experimental and comparative sequence data; partially overlaps the verified gene YJL221C/FSP2
YGL261C	PAU11	-3.15	2.16E-04	Putative protein of unknown function; mRNA expression appears to be regulated by SUT1 and UPC2
YHL046C	PAU13	-3.15	0.01	Putative protein of unknown function; not an essential gene
YBL101W-A	YBL101W-A	-3.11	0.02	Retrotransposon TYA Gag gene co-transcribed with TYB Pol; translated as TYA or TYA-TYB polyprotein; Gag is a nucleocapsid protein that is the structural constituent of virus-like particles (VLPs); similar to retroviral Gag
YIR040C	YIR040C	-3.1	2.44E-05	hypothetical protein
YLR461W	PAU4	-3.09	5.17E-04	Part of 23-member seripauperin multigene family encoded mainly in subtelomeric regions, active during alcoholic fermentation, regulated by anaerobiosis, negatively regulated by oxygen, repressed by heme
YGR294W	PAU12	-3.07	0.01	hypothetical protein
YAL018C	YAL018C	-3.06	0	hypothetical protein
YMR324C	YMR324C	-3.06	1.67E-04	hypothetical protein
YIL176C	PAU14	-3.06	0.02	hypothetical protein
YBR301W	DAN3	-3.01	6.86E-04	Cell wall mannoprotein with similarity to Tir1p, Tir2p, Tir3p, and Tir4p; expressed under anaerobic conditions, completely repressed during aerobic growth
YNR076W	PAU6	-2.97	1.79E-05	Part of 23-member seripauperin multigene family encoded mainly in subtelomeric regions, active during alcoholic fermentation, regulated by anaerobiosis, negatively regulated by oxygen, repressed by heme
YNR069C	BSC5	-2.95	1.43E-04	Protein of unknown function, ORF exhibits genomic organization compatible with a translational readthrough-dependent mode of expression
YOR382W	FIT2	-2.92	0	Mannoprotein that is incorporated into the cell wall via a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor, involved in the retention of siderophore-iron in the cell wall
YBL066C	SEF1	-2.91	0	Putative transcription factor, has homolog in Kluyveromyces lactis
YGL146C	YGL146C	-2.9	0	hypothetical protein
YIL175W	YIL175W	-2.89	0	hypothetical protein

YFL049W	SWP82	-2.89	4.15E-06	Member of the SWI/SNF chromatin remodeling complex in which it plays an as yet unidentified role; has identifiable counterparts in closely related yeast species; abundantly expressed in many growth conditions; paralog of Npl6p
YLL064C	PAU18	-2.89	0.01	hypothetical protein
YNL018C	YNL018C	-2.88	5.18E-05	Putative protein of unknown function
YPL282C	PAU22	-2.86	0.02	hypothetical protein
YKL224C	PAU16	-2.85	0.03	Putative protein of unknown function
YEL070W	DSF1	-2.83	6.14E-06	Deletion suppressor of mpt5 mutation
YNL034W	YNL034W	-2.83	4.43E-05	Putative protein of unknown function; YNL034W is not an essential gene
YHR156C	LIN1	-2.82	4.56E-04	Non-essential component of U5 snRNP; nuclear protein; physically interacts with Irr1p of cohesin complex; may link together proteins involved in chromosome segregation, mRNA splicing and DNA replication
YEL033W	YEL033W	-2.81	0	Predicted to have metabolic role based on analysis of gene networks derived from chromatin immunoprecipitation experiments, experiments on gene deletion mutants, and localization of transcription factor binding sites
YJL221C	FSP2	-2.78	3.04E-04	Protein of unknown function, expression is induced during nitrogen limitation
YML083C	YML083C	-2.77	5.15E-04	Putative protein of unknown function; strong increase in transcript abundance during anaerobic growth compared to aerobic growth; cells deleted for YML083C do not exhibit growth defects in anaerobic or anaerobic conditions
YDR534C	FIT1	-2.74	1.70E-05	Mannoprotein that is incorporated into the cell wall via a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor, involved in the retention of siderophore-iron in the cell wall
YMR094W	CTF13	-2.71	1.46E-05	Subunit of the CBF3 complex, which binds to the CDE III element of centromeres, bending the DNA upon binding, and may be involved in sister chromatid cohesion during mitosis
YNL150W	YNL150W	-2.71	2.80E-04	hypothetical protein; open reading frame extensively overlaps essential uncharacterized ORF YNL149C
YDR542W	PAU10	-2.7	0	hypothetical protein
YJL170C	ASG7	-2.67	0.02	Protein that regulates signaling from a G protein beta subunit Ste4p and its relocalization within the cell; specific to a-cells and induced by alpha-factor
YPL058C	PDR12	-2.66	0.03	Plasma membrane weak-acid-inducible ATP-binding cassette (ABC) transporter, required for weak organic acid resistance, strongly induced by sorbate and benzoate, regulated by War1p, mutants exhibit sorbate hypersensitivity
YLR167W	RPS31	-2.64	4.44E-05	Fusion protein that is cleaved to yield a ribosomal protein of the small (40S) subunit and ubiquitin; ubiquitin may facilitate assembly of the ribosomal protein into ribosomes; interacts genetically with translation factor eIF2B
YJL219W	HXT9	-2.62	0	Putative hexose transporter that is nearly identical to Hxt11p, has similarity to major facilitator superfamily (MFS) transporters, expression of HXT9 is regulated by transcription factors Pdr1p and Pdr3p
YLR140W	YLR140W	-2.62	0.02	hypothetical protein; open reading frame overlaps essential RRN5 gene encoding a member of the UAF transcription factor involved in transcription of rDNA by RNA polymerase I
YOL157C	YOL157C	-2.61	3.12E-05	hypothetical protein
YIL170W	YIL170W	-2.61	0.01	Possible pseudogene in strain S288C; YIL170W/HXT12 and the adjacent ORF, YIL171W, together encode a non-functional member of the hexose transporter family
YIR027C	DAL1	-2.61	0.01	Allantoinase, converts allantoin to allantoate in the first step of allantoin degradation; expression sensitive to nitrogen catabolite repression
YLL025W	PAU17	-2.61	0.01	Putative protein of unknown function; YLL025W is not an essential gene
YDR522C	SPS2	-2.6	0.01	Protein expressed during sporulation, redundant with Sps22p for organization of the beta-glucan layer of the spore wall; <i>S. pombe</i> ortholog is a spore wall component

YIL015W	BAR1	-2.6	0.01	Aspartyl protease secreted into the periplasmic space of mating type a cells, helps cells find mating partners, cleaves and inactivates alpha factor allowing cells to recover from alpha-factor-induced cell cycle arrest
YIL027C	KRE27	-2.6	0.01	Protein of unknown function; null mutant shows K1 killer toxin resistance
YCL020W	YCL020W	-2.59	3.57E-04	Retrotransposon TYA Gag gene co-transcribed with TYB Pol; translated as TYA or TYA-TYB polyprotein; Gag is a nucleocapsid protein that is the structural constituent of virus-like particles (VLPs); similar to retroviral Gag
YIR041W	PAU15	-2.58	0.03	hypothetical protein
YFL053W	DAK2	-2.57	4.77E-04	Dihydroxyacetone kinase, required for detoxification of dihydroxyacetone (DHA); involved in stress adaptation
YJR028W	YJR028W	-2.55	4.64E-05	Retrotransposon TYA Gag gene co-transcribed with TYB Pol; translated as TYA or TYA-TYB polyprotein; Gag is a nucleocapsid protein that is the structural constituent of virus-like particles (VLPs); similar to retroviral Gag
YMR296C	LCB1	-2.55	0.04	Component of serine palmitoyltransferase, responsible along with Lcb2p for the first committed step in sphingolipid synthesis, which is the condensation of serine with palmitoyl-CoA to form 3-ketosphinganine
YHL028W	WSC4	-2.54	1.39E-04	ER membrane protein involved in the translocation of soluble secretory proteins and insertion of membrane proteins into the ER membrane; may also have a role in the stress response but has only partial functional overlap with WSC1-3
YNR063W	YNR063W	-2.53	0	hypothetical protein
YMR279C	YMR279C	-2.52	0.03	hypothetical protein
YJR151C	DAN4	-2.51	0	Cell wall mannoprotein with similarity to Tir1p, Tir2p, Tir3p, and Tir4p; expressed under anaerobic conditions, completely repressed during aerobic growth
YJR158W	HXT16	-2.5	0.01	Protein of unknown function with similarity to hexose transporter family members, expression is repressed by high levels of glucose
YLR198C	YLR198C	-2.5	0.03	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein, based on available experimental and comparative sequence data; overlaps the verified gene SIK1/YLR197W
YKL223W	YKL223W	-2.49	0.02	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein, based on available experimental and comparative sequence data
YOR394W	PAU21	-2.49	0.02	hypothetical protein
YJR026W	YJR026W	-2.47	8.66E-05	Retrotransposon TYA Gag gene co-transcribed with TYB Pol; translated as TYA or TYA-TYB polyprotein; Gag is a nucleocapsid protein that is the structural constituent of virus-like particles (VLPs); similar to retroviral Gag
YJL077C	ICS3	-2.47	0.01	Protein of unknown function
c	YBL094C	-2.47	0.05	hypothetical protein
YIL172C	YIL172C	-2.43	0.01	Putative protein of unknown function with similarity to glucosidases; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm
YLR047C	FRE8	-2.43	0.03	Protein with sequence similarity to iron/copper reductases, involved in iron homeostasis; deletion mutant has iron deficiency/accumulation growth defects; expression increased in the absence of copper-responsive transcription factor Mac1p
YGL260W	YGL260W	-2.42	0.04	Putative protein of unknown function; transcription is significantly increased in a NAP1 deletion background; deletion mutant has increased accumulation of nickel and selenium
YPL277C	YPL277C	-2.41	1.38E-04	hypothetical protein
YNR062C	YNR062C	-2.39	0	hypothetical protein
YDL194W	SNF3	-2.39	1.56E-04	Plasma membrane glucose sensor that regulates glucose transport; has 12 predicted transmembrane segments; long cytoplasmic C-terminal tail is required for low glucose induction of hexose transporter genes HXT2 and HXT4
YIL066C	RNR3	-2.39	0.01	Ribonucleotide-diphosphate reductase (RNR), large subunit; the RNR complex catalyzes the rate-limiting step in dNTP synthesis and is regulated by DNA replication and DNA damage checkpoint pathways via localization of the small subunits

YIL169C	YIL169C	-2.38	1.61E-04	Putative protein of unknown function; serine/threonine rich and highly similar to YOL155C, a putative glucan alpha-1,4-glucosidase; transcript is induced in both high and low pH environments; YIL169C is a non-essential gene
YNL045W	YNL045W	-2.38	1.64E-04	Leucyl aminopeptidase (leukotriene A4 hydrolase) with epoxide hydrolase activity, metalloenzyme containing one zinc atom; role in vivo is not defined; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm and nucleus
YKL187C	YKL187C	-2.37	0	Putative protein of unknown function; detectable in highly purified mitochondria
YGR292W	MAL12	-2.37	0.02	Maltase (alpha-D-glucosidase), inducible protein involved in maltose catabolism; encoded in the MAL1 complex locus
YIL160C	POT1	-2.37	0.03	3-ketoacyl-CoA thiolase with broad chain length specificity, cleaves 3-ketoacyl-CoA into acyl-CoA and acetyl-CoA during beta-oxidation of fatty acids
YBL048W	YBL048W	-2.37	0.05	hypothetical protein
YBL077W	YBL077W	-2.36	0.01	hypothetical protein; open reading frame overlaps 3' end of essential ILS1 gene encoding cytoplasmic isoleucine-tRNA synthetase
YLL034C	RIX7	-2.35	2.04E-04	Putative ATPase of the AAA family, required for export of pre-ribosomal large subunits from the nucleus; distributed between the nucleolus, nucleoplasm, and nuclear periphery depending on growth conditions
YKL221W	MCH2	-2.35	0.01	Protein with similarity to mammalian monocarboxylate permeases, which are involved in transport of monocarboxylic acids across the plasma membrane; mutant is not deficient in monocarboxylate transport
YGR115C	YGR115C	-2.34	0.01	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein, based on available experimental and comparative sequence data; partially overlaps the verified and essential ORF SPT6/YGR115C
YKR105C	YKR105C	-2.33	2.44E-04	hypothetical protein
YDR445C	YDR445C	-2.33	2.93E-04	hypothetical protein
YCL065W	YCL065W	-2.32	2.56E-04	hypothetical protein
YGL063W	PUS2	-2.31	0	Putative pseudouridine synthase
YJL214W	HXT8	-2.31	0.04	Protein of unknown function with similarity to hexose transporter family members, expression is induced by low levels of glucose and repressed by high levels of glucose
YDR491C	YDR491C	-2.3	0.01	hypothetical protein
YNL335W	DDI3	-2.3	0.05	hypothetical protein
YNR073C	YNR073C	-2.29	0.01	hypothetical protein
YNL043C	YNL043C	-2.27	0.03	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein, based on available experimental and comparative sequence data; partially overlaps the verified gene YIP3/YNL044W
YCR041W	YCR041W	-2.25	4.21E-04	hypothetical protein
YHL045W	YHL045W	-2.25	0.04	Putative protein of unknown function; not an essential gene
YOL156W	HXT11	-2.24	6.57E-04	Putative hexose transporter that is nearly identical to Hxt9p, has similarity to major facilitator superfamily (MFS) transporters and is involved in pleiotropic drug resistance
YFL026W	STE2	-2.24	0.01	Receptor for alpha-factor pheromone; seven transmembrane-domain GPCR that interacts with both pheromone and a heterotrimeric G protein to initiate the signaling response that leads to mating between haploid a and alpha cells
YMR103C	YMR103C	-2.23	0	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein, based on available experimental and comparative sequence data
YOR384W	FRE5	-2.23	0	Putative ferric reductase with similarity to Fre2p; expression induced by low iron levels
YOR309C	YOR309C	-2.22	0	hypothetical protein
YMR269W	TMA23	-2.21	5.65E-04	Protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the nucleolus; identified in proteomic screens of ribosomal complexes; YMR269W is not an essential gene
YPL062W	YPL062W	-2.2	0	hypothetical protein
YPL237W	SUI3	-2.2	0	Beta subunit of the translation initiation factor eIF2, involved in the identification of the start codon; proposed to be involved in mRNA binding

YGL227W	VID30	-2.2	0.04	Protein involved in proteasome-dependent catabolite degradation of fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase); shifts the balance of nitrogen metabolism toward the production of glutamate; localized to the nucleus and the cytoplasm
YBL074C	AAR2	-2.19	0.01	Component of the U5 snRNP, required for splicing of U3 precursors; originally described as a splicing factor specifically required for splicing pre-mRNA of the MATa1 cistron
YOR206W	NOC2	-2.19	0.03	Protein that forms a nucleolar complex with Mak21p that binds to 90S and 66S pre-ribosomes, as well as a nuclear complex with Noc3p that binds to 66S pre-ribosomes; both complexes mediate intranuclear transport of ribosomal precursors
YJL216C	YJL216C	-2.18	0.01	Protein of unknown function, similar to alpha-D-glucosidases; transcriptionally activated by both Pdr8p and Yrm1p, along with transporters and other genes involved in the pleiotropic drug resistance (PDR) phenomenon
YFR054C	YFR054C	-2.18	0.02	hypothetical protein
YDR125C	ECM18	-2.17	7.41E-04	Protein of unknown function, similar to Rlp24p
YDL244W	THI13	-2.17	7.69E-04	Protein involved in synthesis of the thiamine precursor hydroxymethylpyrimidine (HMP); member of a subtelomeric gene family including THI5, THI11, THI12, and THI13
YOR381W	FRE3	-2.17	9.05E-04	Ferric reductase, reduces siderophore-bound iron prior to uptake by transporters; expression induced by low iron levels
YJR152W	DAL5	-2.17	0.02	Allantoin permease; ureidosuccinate permease; expression is constitutive but sensitive to nitrogen catabolite repression
YDL203C	ACK1	-2.16	0	hypothetical protein
YGR212W	SLI1	-2.16	0.02	N-acetyltransferase, confers resistance to the sphingolipid biosynthesis inhibitor myriocin (ISP-1) by converting it into N-acetyl-myriocin, cooperates with Ypk1p in mediating resistance to myriocin
YJR053W	BFA1	-2.16	0.04	Component of the GTPase-activating Bfa1p-Bub2p complex involved in multiple cell cycle checkpoint pathways that control exit from mitosis
YAL054C	ACS1	-2.15	0.01	Acetyl-coA synthetase isoform, expressed during growth on nonfermentable carbon sources and under aerobic conditions
YGR287C	YGR287C	-2.14	0	Putative protein of unknown function; similarity to alpha-D-glucosidase (maltase); localizes to the mitochondrion
YCR089W	FIG2	-2.14	0.02	Cell wall adhesin, expressed specifically during mating; may be involved in maintenance of cell wall integrity during mating
YNL325C	FIG4	-2.13	0	Protein required for efficient mating, member of a family of eukaryotic proteins that contain a domain homologous to Sac1p
YDL243C	AAD4	-2.12	0	Putative aryl-alcohol dehydrogenase with similarity to P. chrysosporium aryl-alcohol dehydrogenase, involved in the oxidative stress response
YHR039B-C	YHR039B-C	-2.12	0	Vacuolar H <sup>+</sup> ATPase subunit G of the catalytic (V1) sector, involved in vacuolar acidification
YHR212C	YHR212C	-2.11	0	hypothetical protein
YIL072W	HOP1	-2.11	0.01	Meiosis-specific DNA binding protein that displays Red1p dependent localization to the unsynapsed axial-lateral elements of the synaptonemal complex; required for homologous chromosome synapsis and chiasma formation
YML074C	FPR3	-2.1	0.03	Nucleolar peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase); FK506 binding protein; phosphorylated by casein kinase II (Cka1p-Cka2p-Ckb1p-Ckb2p) and dephosphorylated by Ptp1p
YDR314C	RAD34	-2.1	0.04	Protein involved in nucleotide excision repair (NRE); homologous to RAD4
YDR536W	STL1	-2.09	0	Glycerol proton symporter of the plasma membrane, subject to glucose-induced inactivation, strongly but transiently induced when cells are subjected to osmotic shock
YKL174C	TPO5	-2.09	0.01	Protein involved in excretion of putrescine and spermidine; putative polyamine transporter in the Golgi or post-Golgi vesicles
YDL246C	SOR2	-2.08	0	Protein of unknown function, computational analysis of large-scale protein-protein interaction data suggests a possible role in fructose or mannose metabolism
YNR065C	YSN1	-2.08	0	Sortilin homolog, interacts with proteins of the endocytic machinery
YOR285W	YOR285W	-2.08	0.03	Protein of unknown function, localized to the mitochondrial outer membrane

YCR061W	YCR061W	-2.06	0	Protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm in a punctate pattern
YOL098C	YOL098C	-2.06	0	Putative metalloprotease
YGL075C	MPS2	-2.05	0.03	Essential membrane protein localized at the nuclear envelope and spindle pole body (SPB), required for insertion of the newly duplicated SPB into the nuclear envelope; potentially phosphorylated by Cdc28p
YBR300C	YBR300C	-2.05	0.04	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein, based on available experimental and comparative sequence data; partially overlaps the verified gene YBR301W; YBR300C is not an essential gene
YOL141W	PPM2	-2.04	0.01	Putative carboxyl methyl transferase, has similarity to Ppm1p but biochemical activity not yet demonstrated
YDL158C	YDL158C	-2.04	0.03	hypothetical protein
YLR037C	DAN2	-2.03	0.01	Cell wall mannoprotein with similarity to Tir1p, Tir2p, Tir3p, and Tir4p; expressed under anaerobic conditions, completely repressed during aerobic growth
YMR232W	FUS2	-2.02	0	Cytoplasmic protein localized to the shmoo tip; required for the alignment of parental nuclei before nuclear fusion during mating
YGR274C	TAF1	-2.02	0.02	TFIID subunit (145 kDa), involved in RNA polymerase II transcription initiation, has histone acetyltransferase activity, involved in promoter binding and G1/S progression
YLR361C	DCR2	-2.01	0	Putative phosphoesterase that functions as a dosage-dependent positive regulator of the G1/S phase transition by controlling the timing of START
YER025W	GCD11	-2	0.01	Gamma subunit of the translation initiation factor eIF2, involved in the identification of the start codon; binds GTP when forming the ternary complex with GTP and tRNA <sup>i</sup> -Met
YOR054C	VHS3	-2	0.01	Functionally redundant (see also SIS2) inhibitory subunit of Ppz1p, a PP1c-related ser/thr protein phosphatase Z isoform; synthetically lethal with sis2; putative phosphopantothenoylcysteine decarboxylase involved in coenzyme A biosynthesis
YJR154W	YJR154W	-2	0.05	Putative protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm
YOL164W	BDS1	-1.99	0.01	Bacterially-derived sulfatase required for use of alkyl- and aryl-sulfates as sulfur sources
YJR156C	THI11	-1.98	0.01	Protein involved in synthesis of the thiamine precursor hydroxymethylpyrimidine (HMP); member of a subtelomeric gene family including THI5, THI11, THI12, and THI13
YAR066W	YAR066W	-1.98	0.04	hypothetical protein
YCR102C	YCR102C	-1.98	0.05	Putative protein of unknown function; involved in copper metabolism; similar to C.carbonum toxD gene; YCR102C is not an essential gene
YHR125W	YHR125W	-1.97	0.01	hypothetical protein
YBR012W-A	YBR012W-A	-1.96	0.01	Retrotransposon TYA Gag gene co-transcribed with TYB Pol; translated as TYA or TYA-TYB polyprotein; Gag is a nucleocapsid protein that is the structural constituent of virus-like particles (VLPs); similar to retroviral Gag
YHL034C	SBP1	-1.96	0.05	Nucleolar single-strand nucleic acid binding protein; associates with small nuclear RNAs
YMR316C-A	YMR316C-A	-1.95	0.02	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein, based on available experimental and comparative sequence data; completely overlaps the verified gene DIA1/YMR316W
YGL138C	YGL138C	-1.95	0.03	hypothetical protein
YMR046C	YMR046C	-1.95	0.04	Retrotransposon TYA Gag gene co-transcribed with TYB Pol; translated as TYA or TYA-TYB polyprotein; Gag is a nucleocapsid protein that is the structural constituent of virus-like particles (VLPs); similar to retroviral Gag
YNL117W	MLS1	-1.95	0.05	Malate synthase, enzyme of the glyoxylate cycle, involved in utilization of non-fermentable carbon sources; expression is subject to carbon catabolite repression; localizes in peroxisomes during growth in oleic acid medium
YGR289C	MAL11	-1.94	0	Maltose permease, inducible high-affinity maltose transporter (alpha-glucoside transporter); encoded in the MAL1 complex locus; member of the 12 transmembrane domain superfamily of sugar transporters
YMR007W	YMR007W	-1.94	0.01	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein, based on available experimental and comparative sequence data

YPL164C	MLH3	-1.94	0.01	Protein involved in DNA mismatch repair; forms a complex with Mlh1p to promote meiotic crossing-over; mammalian homolog is implicated mammalian microsatellite instability
YER067W	YER067W	-1.93	0.01	hypothetical protein
YGL220W	YGL220W	-1.93	0.01	Putative protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm and the nucleus
YNL143C	YNL143C	-1.93	0.02	hypothetical protein
YOR389W	YOR389W	-1.91	0	hypothetical protein
YCR084C	TUP1	-1.91	0.02	General repressor of transcription, forms complex with Cyc8p, involved in the establishment of repressive chromatin structure through interactions with histones H3 and H4, appears to enhance expression of some genes
YGL219C	MDM34	-1.91	0.02	Mitochondrial outer membrane protein, required for normal mitochondrial morphology and inheritance; localizes to dots on the mitochondrial surface near mtDNA nucleoids; interacts genetically with MDM31 and MDM32
YBR299W	MAL32	-1.91	0.05	Maltase (alpha-D-glucosidase), inducible protein involved in maltose catabolism; encoded in the MAL3 complex locus; functional in genomic reference strain S288C
YMR135C	GID8	-1.9	0.01	Protein of unknown function, involved in proteasome-dependent catabolite inactivation of fructose-1,6-bisphosphatase; contains LisH and CTLH domains, like Vid30p; dosage-dependent regulator of START
YGL188C	YGL188C	-1.88	0.01	hypothetical protein
YHL032C	GUT1	-1.88	0.01	Glycerol kinase, converts glycerol to glycerol-3-phosphate; glucose repression of expression is mediated by Adr1p and Ino2p-Ino4p; derepression of expression on non-fermentable carbon sources is mediated by Opi1p and Rsf1p
YOR169C	YOR169C	-1.88	0.01	Hypothetical protein; open reading frame overlaps 3' end of essential GLN4 gene encoding glutamine-tRNA ligase
YDR256C	CTA1	-1.88	0.02	Catalase A, breaks down hydrogen peroxide in the peroxisomal matrix formed by acyl-CoA oxidase (Pox1p) during fatty acid beta-oxidation
YNR056C	BIO5	-1.88	0.04	Putative transmembrane protein involved in the biotin biosynthesis pathway; responsible for uptake of 7-keto 8-aminopelargonic acid; BIO5 is in a cluster of 3 genes (BIO3, BIO4, and BIO5) that mediate biotin synthesis
YOR092W	ECM3	-1.87	0.01	Non-essential protein of unknown function
YLR103C	CDC45	-1.86	0.01	DNA replication initiation factor; recruited to MCM pre-RC complexes at replication origins; promotes release of MCM from Mcm10p, recruits elongation machinery; mutants in human homolog may cause velocardiofacial and DiGeorge syndromes
YDL218W	YDL218W	-1.85	0.01	hypothetical protein
YIR029W	DAL2	-1.85	0.03	Allantoicase, converts allantoate to urea and ureidoglycolate in the second step of allantoin degradation; expression sensitive to nitrogen catabolite repression and induced by allophanate, an intermediate in allantoin degradation
YAL047C	SPC72	-1.85	0.05	Component of the cytoplasmic Tub4p (gamma-tubulin) complex, binds spindle pole bodies and links them to microtubules; has roles in astral microtubule formation and stabilization
YLR173W	YLR173W	-1.84	0.01	hypothetical protein
YCLX08C	YCLX08C	-1.84	0.02	Protein of unknown function, involved in the integration of lipid signaling pathways with cellular homeostasis
YCR091W	KIN82	-1.84	0.02	Putative serine/threonine protein kinase, most similar to cyclic nucleotide-dependent protein kinase subfamily and the protein kinase C subfamily
YBR074W	YBR074W	-1.84	0.03	Putative metalloprotease
YNL332W	THI12	-1.84	0.04	Protein involved in synthesis of the thiamine precursor hydroxymethylpyrimidine (HMP); member of a subtelomeric gene family including THI5, THI11, THI12, and THI13
YDR285W	ZIP1	-1.84	0.05	Transverse filament protein of the synaptonemal complex; required for normal levels of meiotic recombination and pairing between homologous chromosome during meiosis; potential Cdc28p substrate
YFR040W	SAP155	-1.83	0.02	Protein that forms a complex with the Sit4p protein phosphatase and is required for its function; member of a family of similar proteins including Sap4p, Sap185p, and Sap190p

---

YJL103C	GSM1	-1.83	0.04	Putative zinc cluster protein of unknown function; computationally predicted involvement in oxidative phosphorylation, based on patterns of expression and sequence analysis
YNR075W	COS10	-1.82	0.01	Protein of unknown function, member of the DUP380 subfamily of conserved, often subtelomerically-encoded proteins
YGR164W	YGR164W	-1.81	0.03	hypothetical protein
YFR023W	PES4	-1.81	0.05	Poly(A) binding protein, suppressor of DNA polymerase epsilon mutation, similar to Mip6p
YNR066C	YNR066C	-1.8	0.01	hypothetical protein
YOL166C	YOL166C	-1.8	0.01	hypothetical protein

# **BIBLIOGRAFIA**

---

1. Dulbecco, Vogt, Evidence for a ring structure of polyoma virus DNA. Proc Natl Acad Sci U S A, 50, 236, 1963
2. Reidemeister, Knotentheorie Ergebnisse der Mathematik, Springer, Berlin, 1932, 74.
3. Frank-Kamenetskii, Lukashin, Vologodskii, Statistical mechanics and topology of polymer chains. Nature. 1975 Dec 4; 258, 398-402
4. Klenin, Vologodskii, Anshelevich, Dykhne, Frank-Kamenetskii ,Effect of excluded volume on topological properties of circular DNA. Biomol Struct Dyn. 1988 Jun; 5, 1173-85.
5. Rybenkov, Cozzarelli, Vologodskii, Probability of DNA knotting and the effective diameter of the DNA double helix. Proc Natl Acad Sci U S A 1993 Jun 1; 90, 5307-11
6. Wang, Interaction between DNA and an E. coli pprotein  $\omega$ , J. Mol. Biol., 217,413,1971
7. Lewin B, Genes VI Oxford University Press 1997
8. Vologodskii AV, Levene SD, Klenin KV, Frank-Kamenetskii M, Cozzarelli NR. Conformational and thermodynamic properties of supercoiled DNA. J Mol Biol. 1992 Oct 20; 227, 1224-43
9. Champoux J, DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism Annu. Rev. Biochem. 2001, 70, 369-413
10. Giaever GN and Wang JC. Supercoiling of intracellular DNA can occur in eukaryotic cells, Cell, 1988, 55, 849-856
11. Wu HY, Shy S, Wang JC and Liu LF. Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template, Cell, 1988, 53, 433-440
12. Stewart L, Ireton GC, Champoux J, Reconstitution of human topoisomerase I by fragment complementation J Mol Biol. 1997, 269, 355-372

13. Christensen MO, Barthelmes HU, Boege F, Mielke C, The N-terminal domain anchors human topoisomerase I at fibrillar centers of nucleoli and nucleolar organizer regions of mitotic chromosomes *J Biol Chem* 2002, 277, 35932-35938
14. Stewart L, Ireton GC, and Champoux JJ. The domain organization of human Topoisomerase I. *J Biol Chem*, 1996, 271, 7602-7608
15. Scaldaferro S, Tinelli S, Borgnetto ME, Azzini A, Capranico G. Directed evolution to increase camptothecin sensitivity of human DNA topoisomerase I. *Chem Biol*. 2001 Sep, 8, 871-81.
16. Krogh BO, Shuman S, *Mol Cell*, 2000, 5, 1035-41
17. Keeney, S. Mechanism and control of meiotic recombination initiation. *Curr Top Dev Biol*, 2001, 52, 1-53.
18. Capranico G, Binaschi M, DNA sequence selectivity of topoisomerases and topoisomerase poisons *Biochim Biophys Acta*, 1998, 185-94
19. Pommier Y, Pourquier P, Fan Y, Strumberg D, Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme *Biochim Biophys Acta*, 1998, 83-106
20. Reid R, Benedetti P, Bjornsti MA, Yeast as a model organism for studying the actions of DNA topoisomerase-targeted drugs *Biochim Biophys Acta*, 1998, 289-300
21. Giovannella BC, Stehlin JS, Wall ME, Wani MC, Nicholas AW, Liu LF, Silber R, Potmesil M, *Science*, 1989, 246, 1046-48
22. Nitiss J, Wang JC, DNA topoisomerase-targeting antitumor drugs can be studied in yeast *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988, 85, 7501-05
23. Takimoto CH, Wright J, Arbuck SG, Clinical applications of the camptothecins *Biochim Biophys Acta*, 1998, 107-19
24. Yang D, Strode JT, Spielmann HP, Wang AHJ, Burke TG, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, 120, 2979-80

25. Staker BL, Hjerrild K, Feese MD, Behnke Ca, Burgin AB, Stewart L, The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99, 15387-92
26. Kaufmann SH, Cell death induced by topoisomerase-targeted drugs: more questions than answers Biocim Biophys Acta, 1998, 195-211
27. Corbett AH, Osheroff N. When good enzymes go bad: conversion of topoisomerase II to a cellular toxin by antineoplastic drugs. Chem Res Toxicol. 1993, 6, 585-97
28. Sorensen BS, Sinding J, Andersen AH, Alsner J, Jensen PB, Westergaard O. Mode of action of topoisomerase II-targeting agents at a specific DNA sequence. Uncoupling the DNA binding, cleavage and religation events. J Mol Biol. 1992, 228, 778-86.
29. Robinson MJ, Martin BA, Gootz TD, McGuirk PR, Moynihan M, Sutcliffe JA, Osheroff N. Effects of quinolone derivatives on eukaryotic topoisomerase II. A novel mechanism for enhancement of enzyme-mediated DNA cleavage. J Biol Chem. 1991, 266, 14585-92.
30. Froelich-Ammon SJ, Patchan MW, Osheroff N, Thompson RB. Topoisomerase II binds to ellipticine in the absence or presence of DNA. Characterization of enzyme-drug interactions by fluorescence spectroscopy. J Biol Chem., 1995, 270, 14998-5004.
31. Nitiss J, Investigating the biological functions of DNA topoisomerases in eukaryotic cells Biocim Biophys Acta, 1998, 63-81
32. Liu LF, Wang JC, Supercoiling of the DNA template during transcription Proc Natl Acad Sci U S A, 1987, 84, 7024-7027
33. Wang JG, Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective NPG 2002, 3
34. Nitiss JL, Roles of DNA topoisomerases in chromosomal replication and segregation Adv. Pharmacol. 1994, 29, 103-134
35. Kim RA, Wang JC, Function of DNA topoisomerases as replication swivels in *Saccharomyces cerevisiae* J. Mol. Biol. 1989, 208, 257-267

36. Brill SJ, DiNardo S, Voelkel-Meiman K, Sternglanz R, Need for DNA topoisomerase activity as a swivel for DNA replication for transcription of ribosomal RNA *Nature* 1987, 326, 414-416
37. Oh M, Choi I, Dai Park S, Topoisomerase III is required for accurate DNA replication and chromosome segregation in *Schizosaccharomyces pombe* *Nucleic Acids Research* 2002, 30
38. Christman MF, Dietrich FS, Fink GR, Mitotic recombination in the rDNA of *S. cerevisiae* is suppressed by the combined action of DNA topoisomerases I and II *Cell*, 1988, 55, 413-25
39. Kim RA, Wang JC, A subthreshold level of DNA topoisomerases leads to the excision of yeast rDNA as extrachromosomal ring *Cell*, 1989, 57, 975-85
40. Adachi Y, Luke M, Laemmli UK, Chromosome assembly in vitro: topoisomerase II is required for condensation *Cell*, 1991, 64, 137-48
41. Hirano T, Mitchison TJ, Topoisomerase II does not play a scaffolding role in organization of mitotic chromosomes assembled in *Xenopus* egg extracts *J. Cell Biol.* 1993, 120, 601-12
42. Thrash C, Bankier AT, Barrel BG, Sternglanz R, Cloning, characterization, and sequence of yeast DNA topoisomerase I gene *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985, 82, 4374-78
43. Buchenau P, Saumweber H and Arndt-Jovin DJ. Consequences of topoisomerase II inhibition in early embryogenesis of *Drosophila* revealed by in vivo confocal laser scanning microscopy. *L. Cell Sci.*, 1993, 104, 1175-1185,
44. Brill S.J., Sternglanz R., Transcription-dependent DNA supercoiling in yeast DNA topoisomerase mutants, *Cell*, 1988, 54, 403-411
45. Choder M, A general topoisomerase I-dependent transcriptional repression in the stationary phase in yeast *Genes Dev*, 1991, 5, 2315-26
46. Shaiu WL, Hsieh TS, Targeting to transcriptionally active loci by the hydrophilic N-terminal domain of *Drosophila* DNA topoisomerase I *Mol Cell Biol*, 1998, p.4358-4367

47. Merino A, Madden KR, Lane WS, Champoux JC, Reinberg D, DNA topoisomerase I is involved in both repression and activation of transcription *Nature* 1993, 365
48. Kretzschmar M, Meisterernst M, Roeder RG, Identification of human DNA topoisomerase I as a cofactor for activator-dependent transcription by RNA polymerase II *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90, 11508-11512
49. Shykind BM, Kim J, Stewart L, Champoux JC, Topoisomerase I enhances TFIID-TFIIA complex assembly during activation of transcription *Genes Dev*, 1997, 11, 397-407
50. Carty SM, Greenleaf AL, Hyperphosphorylated C-terminal repeat domain-associating protein in the nuclear proteome link transcription to DNA/chromatin modification and RNA processing *Mol Cell Proteomics*, 2002, 1, 598-610
51. Khobta A., Ferri F., Lotito L., Montecucco A., Rossi R., Caprinico G., Early effects of topoisomerase I inhibition on RNA polymerase II along transcribed genes in human cells, *J. Mol. Biol.* 2006, 357, 127-138
52. Vogelauer M, Cioci F, Camilloni G, DNA protein-interactions at the *Saccharomyces cerevisiae* 35 S rRNA promoter and in its surrounding region *J. Mol. Biol.* 1998, 275, 197-209
53. Bordi L, Cioci F, Camilloni G, In vivo binding and hierarchy of assembly of the yeast RNA Polymerase I transcription factors *Molecular Biology of the Cell* Vol.12, 753-760, March 2001
54. Cioci F, Vogelauer M, Camilloni G, Acetylation and accessibility of rDNA chromatin in *Saccharomyces cerevisiae* in  $\Delta top1$  and  $\Delta sir2$  mutants *J. Mol. Biol.*, 2002, 322, 41-52
55. Schultz M, Brill SJ, Ju Q, Sternglanz R, Reeder RH, Topoisomerase I and yeast rRNA transcription: negative supercoiling stimulates initiation and topoisomerase activity is required for elongation *Genes Dev*, 6, 1332-41
56. Gradal O, Mariotte-Labarre S, Chedin S, Quemeneur E, Carles C, Sentenac A, Thuriaux P, A34.5 a non essential component of yeast RNA Polymerase I, cooperates with subunit A14 and DNA Topoisomerase I to produce a functional rRNA synthesis machine *Mol Cell Biol*, 1997, 1787-95

57. Gartenberg MR. The Sir proteins of *Saccharomyces cerevisiae*: mediators of transcriptional silencing and much more. *Curr Opin Microbiol.* 2000, 3, 132-7.
58. Imai, S., Armstrong, C.M., Kaerberlein, M., and Guarente, L. Transcriptional silencing and longevity protein sir2 in an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 2000, 403, 795-800
59. Noriyuki Suka, Kunheng Luo & Michael Grunstein Sir2p and Sas2p opposingly regulate acetylation of yeast histone H4 lysine 16 and spreading of heterochromatin *Nature Genetics* 2002, 32, 378-383
60. Bryk M, Banerjee M, Murphy M, Knudsen KE, Garfinkel DJ, Curcio MJ. Transcriptional silencing of Ty1 elements in the RDN1 locus of yeast. *Genes Dev.* 1997, 11, 255-69.
61. Jaxel C, Capranico G, Kerrigan D, Kohn KW, Pommier Y. Effect of local DNA sequence on topoisomerase I cleavage in the presence or absence of camptothecin. *J Biol Chem.* 1991, 266, 20418-23.
62. Yoon H.J., Choi I.Y., Kang M. R., Kim S. S., Muller M. T., Spitzner J. R., Chung I. K. DNA topoisomerase II cleavage of telomeres in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta.* 1998, 1395, 110-20.
63. Kang MR, Muller T, Chung K, Telomeric DNA damage by topoisomerase I. A possible mechanism for cell killing by camptothecin. *J Biol Chem.* 2004, 279, 12535-41
64. Louis E, Naumova ES, Lee A, Naumov G and Haber JE. The Chromosome end in Yeast: Its mosaic nature and influence on recombinational dynamics; *Genetics*, 1994, 136, 789-802
65. Vega-Palas MA, Venditti S, Di Mauro E. Heterochromatin Organization of a natural Yeast Telomere, *Jour Biol Chem* 1998, 273, 9388-9392
66. Venditti S, Vega-Palas MA, Di Mauro E. Heterochromatin Organization of a natural Yeast Telomere"; *J Biol Chem* 1999, 274, 1928-1933
67. Pryde FE, Louis EJ. Limitations of silencing at native yeast telomeres. *EMBO J.* 1999, 18, 2538-50

68. Del Vescovo V, De Sanctis V, Bianchi A, Shore D, Di Mauro E and Negri R. Distinct DNA elements contribute to Rap1p affinity for its binding sites, *J. Mol. Biol.* 2004, 338, 877- 893
69. Grunstein M, Molecular model for telomeric heterochromatin in yeast, *Curr Opin Cell Biol* 1997, 9, 383-387
70. Luo K, Vega-Palas MA, Grunstein M Rap1-Sir4 binding independent of other Sir, yKu, or histone interactions initiates the assembly of telomeric heterochromatin in yeast, *Genes Dev.*, 2002, 16, 1528-1539
71. Connelly JJ, Yuan P, Li PZ, Xu RM, Sternglanz R. Structure and function of *Saccharomyces cerevisiae* Sir3 BAH domain, *Mol. Cell. Biol.* 2006, 26, 3256- 3265
72. Wang, Y. H., and J. D. Griffith The [(G/C)<sub>3</sub>NN]<sub>n</sub> motif: a common DNA repeat that excludes nucleosomes, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93, 8863-8867
73. Ng HH, Ciccone DN, Morshead KB, Oettinger MA, Struhl K. Lysine-79 of histone H3 is hypomethylated at silenced loci in yeast and mammalian cells: a potential mechanism for position-effect variegation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003, 100, 1820-5
74. Santos-Rosa H, Bannister AJ, Dehe PM, Geli V, Kouzarides T. Methylation of H3 lysine 4 at euchromatin promotes Sir3p association with heterochromatin. *J Biol Chem.* 2004, 279, 47506-12
75. Tompa R, Madhani HD. Histone H3 Lysine 36 Methylation Antagonizes Silencing in *Saccharomyces cerevisiae* Independently of the Rpd3S Histone Deacetylase Complex. *Genetics.* 2007, 175, 585-93
76. Rusche LN, Kirchmaier AL, Rine J. The establishment, inheritance, and function of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Biochem.* 2003;72, 481-516
77. Kimura A, Umehara T, Horikoshi M. Chromosomal gradient of histone acetylation established by Sas2p and Sir2p functions as a shield against gene silencing. *Nat Genet.* 2002, 32, 370-7
78. Meneghini MD, Wu M, Madhani HD. Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell.* 2003, 112, 725-36

79. Lindsley, J.E. and Wang, J.C. 1991. Proteolysis patterns of epitopically labeled yeast DNA topoisomerase II suggest an allosteric transition in the enzyme induced by ATP binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 88, 10485-10489
80. Grosu P, Townsend JP, Hartl DL, Cavalieri D. Pathway processor: a tool for integrating whole-genome expression results into metabolic networks *Genome Research*, 12, 1121-1126
81. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium *Nat Genet.* 2000, 25, 25-9
82. Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, O'Shea EK, Weissman JS. Global analysis of protein expression in yeast *Nature.* 2003, 425, 737-41
83. Subramanian D, Furbee CS, Muller MT. ICE bioassay. Isolating in vivo complexes of enzyme to DNA. *Methods Mol Biol.* 2001; 95, 137-47.
84. Longtine MS, McKenzie A 3rd, Demarini DJ, Shah NG, Wach A, Brachat A, Philippsen P, Pringle JR. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 1998, 14, 953-61.
85. Bi X., Broach R. DNA in transcriptionally silent chromatin assumes a distinct topology that is sensitive to cell cycle progression, *Mol Cell Biol* 1997, 7077-7087
86. Cheng TH, Li YC, Gatemberg R, Persistence of an alternate chromatin structure at silenced loci in the absence of silencers, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1998, 5521-5526
87. Gueldener U, Heinisch J, Koehler GJ, Voss D, Hegemann JH, A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast, *Nucleic Acids Res*, 2002, 30, e23
88. Bourns BD, Alexander MK, Smith AM, Zakian VA Sir proteins, Rif protens, and Cd13p bind *Saccharomyces cerevisiae* telomeres invivo, *Mol. Cell. Biol.*, 1998, 5600-5608

89. Dorman, C.J. and Deighan, P. Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2003. 13, 179-184
90. Hatfield, G.W. and Benham, C.J. DNA topology-mediated control of global gene expression in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* 2002, 36, 175-203
91. Pruss, G.J. and Drlica, K. DNA supercoiling and prokaryotic transcription. *Cell* 1989, 56, 521-523
92. Peter, B.J., Arsuaga, J., Breier, A.M., Khodursky, A.B., Brown, P.O., and Cozzarelli, N.R. Genomic transcriptional response to loss of chromosomal supercoiling in *Escherichia coli*. *Genome Biol.* 2004, 5, R87
93. Crozat, E., Philippe, N., Lenski, R.E., Geiselmann, J., and Schneider, D. Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. XII. DNA topology as a key target of selection. *Genetics* 2005, 169, 523-532
94. Sekinger EA, Gross DS. Silenced chromatin is permissive to activator binding and PIC recruitment. *Cell.* 2001, 105, 403-14
95. Martens C, Krett B, Laybourn PJ. RNA polymerase II and TBP occupy the repressed CYC1 promoter. *Mol Microbiol.* 2001, 40, 1009-19
96. Breiling A, Turner BM, Bianchi ME, Orlando V. General transcription factors bind promoters repressed by Polycomb group proteins. *Nature.* 2001, 412, 651-5
97. Bevins RL, Zimmer SG. It's about time: scheduling alters effect of histone deacetylase inhibitors on camptothecin-treated cells. *Cancer Res.* 2005, 65, 6957-66
98. Pommier, Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat. Rev. Cancer* 2006, 6, 789-802