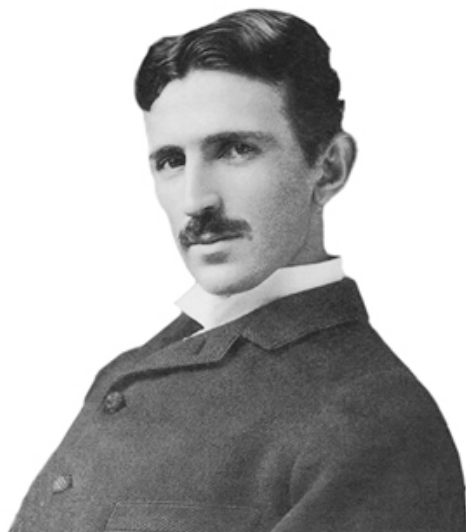


**Dottorato in Oncobiologia Sperimentale Presso il Dipartimento di Scienze
Biochimiche dell'Università degli Studi di Palermo del Policlinico Paolo
Giaccone di Palermo
Settore Scientifico disciplinare: Bio/11
Ciclo: XIX**

Ruolo del Rimodellatore della Cromatina ATP-dipendente ISWI nel Controllo del Ciclo Cellulare e del Differenziamento.

Walter Arancio 2008 copyright
All rights reserved- Tutti i diritti sono riservati
ISBN 978-1-4457-9611-6



**Tratto dalla tesi del
Dottorando Dott. Walter Arancio
Tutor Prof. Giuseppe Calvaruso
Coordinatore Prof. Giovanni Tesoriere**

ORGANIZZAZIONE DELLA CROMATINA:

Le cellule eucariotiche conservano la propria informazione genetica sottoforma di cromatina, un complesso di DNA e proteine sia strutturali che regolative. L'unità funzionale modulare della cromatina è il nucleosoma. Il nucleosoma è formato da un ottamero di proteine istoniche che ha avvolto attorno a sé circa 150 paia di basi di DNA (Woodcock CL, 2006). I nucleosomi, a loro volta, si organizzano in strutture di ordine superiore sempre più complesse, sino ad arrivare alla struttura altamente condensata dei cromosomi metafasici (Woodcock CL, 2006). La compattazione del DNA sottoforma di cromatina permette l'organizzazione del genoma all'interno del nucleo in strutture topologicamente complesse, in grado di immagazzinare una enorme quantità di DNA in uno spazio ristretto quale è in nucleo. Ad esempio il DNA di una cellula umana è lungo più di un metro e risiede in un nucleo del diametro di circa 8 μM . Il compattamento del DNA in cromatina permette l'immagazzinamento dell'informazione genetica in uno spazio compatibile con i processi biologici che avvengono nel nucleo, ma altresì pone il problema di costituire una barriera fisica all'accesso regolato di fattori al DNA stesso.

RIMODELLATORI DELLA CROMATINA:

Sono state isolate due grandi famiglie di fattori in grado di regolare l'accesso alla cromatina. La prima famiglia è composta da modificatori della cromatina covalenti, la seconda famiglia è composta da rimodellatori della cromatina ATP-dipendenti.

I modificatori covalenti della cromatina sono generalmente complessi multiproteici che modificano covalentemente le proteine istoniche, tramite acetilazione, metilazione, fosforilazione, ubiquitinazione e poli-ADP ribosilazione (Iizuka M., Smith MM, 2003; Jenuwein T, Allis CD, 2001). Le modifiche reversibili a carico degli istoni avvengono generalmente sulle loro code ammino-terminali, dove cadono le modifiche con elevata frequenza rispetto alla restante parte della proteina. Secondo la recente ipotesi del "codice istonico", queste modifiche reversibili a carico delle code ammino-terminali degli istoni sono riconosciute da altre proteine che modulano l'accessibilità della cromatina in base al tipo ed alla complessità delle modifiche stesse. Secondo quest'ipotesi, i modificatori covalenti della cromatina scrivono

una sorta di codice dinamico sopra il codice statico della sequenza primaria del DNA che, interpretato da altre proteine regolative nucleari, ne modula la funzione, regolandone l'accessibilità (Iizuka M, Smith MM, 2003; Jenuwein T, Allis CD, 2001).

I rimodellatori della cromatina ATP-dipendenti invece sfruttano l'energia di idrolisi dell'ATP per alterare direttamente la topologia della cromatina, principalmente alterando il posizionamento relativo dell'ottamero istonico sul filamento di DNA (Becker PB, Horz W, 2002). È accertato che le sequenze di DNA avvolte attorno all'ottamero istonico siano funzionalmente inattive, come se l'ottamero istonico funzionasse da repressore dell'accesso di queste sequenze. Lo spostamento regolato dell'ottamero istonico permette di rendere accessibili specifiche sequenze del DNA. Sono sempre più le evidenze sperimentali che suggeriscono che questo sia uno dei meccanismi di base che regola il metabolismo del DNA e l'espressione genica (Becker PB, Horz W, 2002).

Generalmente i complessi di rimodellamento della cromatina ATP-dipendenti si possono suddividere in due sottofamiglie. Della prima fanno parte quelli che generalmente aprono la struttura cromatinica e funzionano da attivatori trascrizionali; mentre della seconda fanno parte i rimodellatori che generalmente compattano la struttura cromatinica e funzionano da repressori trascrizionali (Becker PB, Horz W, 2002). Le modificazioni della cromatina ATP-dipendenti e le modificazioni covalenti sono catalizzate da complessi di rimodellamento formati da molte subunità che tendono ad essere conservate dal punto di vista evolutivo (Iizuka M, Smith MM, 2003; Jenuwein T, Allis CD, 2001; Becker PB, Horz W, 2002). Recenti evidenze sperimentali indicano che i rimodellatori covalenti della cromatina ed i rimodellatori della cromatina ATP-dipendenti possano lavorare in concerto per regolare il metabolismo del DNA (Burgio G, et al., 2008).

CANCRO ED EPIGENETICA:

Il dinamico processo di regolazione operato dai rimodellatori della cromatina senza alterare la sequenza primaria del DNA è studiato dall'epigenetica. L'epigenetica studia quindi in che modo le modifiche topologiche e covalenti della cromatina possano influenzare le funzioni nucleari quali l'organizzazione dei cromosomi, la riparazione del DNA,

la replicazione del DNA ed altre funzioni, prima fra tutte la trascrizione. (Turner BM, 2002; Bugio G, et al., 2008; Baylin SB, Ohm JE, 2006)

Tradizionalmente, il cancro è stato visto come una malattia a base genetica provocata dall'accumulo sequenziale di mutazioni a carico di specifici geni che porta all'attivazione costitutiva di oncogeni ed alla perdita di funzione di geni oncosoppressori che a sua volta porta ad una alterata regolazione del ciclo cellulare ed alla trasformazione neoplastica (Baylin SB, Ohm JE, 2006; Sparmann A, van Lohuizen M, 2006). Tuttavia è sempre più evidente che lo sviluppo tumorale possa essere causato da alterazioni epigenetiche del genoma (Baylin SB, Ohm JE, 2006; Sparmann A, van Lohuizen M, 2006). I cambiamenti epigenetici possono portare ad una alterata espressione genica che, anche non coinvolgendo modifiche della sequenza primaria del DNA, può contribuire fortemente alla trasformazione cellulare. Sebbene siano note numerose associazioni tra modificatori covalenti della cromatina e cancro, come le acetil-trasferasi degli istoni (HAT) (Minucci S, Pelicci PG, 2006) evidenze sperimentali che supportino un ruolo dei complessi di rimodellamento ATP dipendente nel cancro sono emerse solo di recente (Roberts CWM, Orkin SH, 2004).

Mutazioni in SNF5/INI1, una subunità del complesso di rimodellamento della cromatina ATP-dipendente SWI/SNF che regola positivamente la trascrizione, sono state trovate in tumori rabdoidi maligni, un tipo di cancro giovanile altamente aggressivo (Roberts CWM, Orkin SH, 2004). Mutazioni specifiche in BRG1, la subunità catalitica del complesso SWI/SNF, sono state identificate in cancro pancreatici, polmonari, del seno e prostatici (Roberts CW M, Orkin SH, 2004). In modo concorde, la perdita di omozigosi o l'aploinsufficienza di SNF5/INI1 e BRG1 predispone, in topo, all'insorgenza del cancro (Roberts CWM, Orkin SH, 2004). Inoltre, evidenze *in vitro* indicano che il complesso SWI/SNF interagisce direttamente con proteine anti e pro-oncogeniche, come RB, BRCA1, c-MYC e MLL (Roberts CWM, Orkin SH, 2004).

IL RIMODELLATORE DELLA CROMATINA ATP-DIPENDENTE ISWI

Il controllo del ciclo cellulare si basa su un sottile equilibrio tra attivazione e repressione trascrizionale. In quest'ottica, è importante

capire il ruolo dei rimodellatori della cromatina ATP-dipendenti sia attivatori che repressori. Il ruolo del rimodellatore SWI/SNF, con funzioni generalmente di attivatore trascrizionale, è all'inizio della sua comprensione, mentre il contributo alla regolazione del ciclo cellulare ad opera dei rimodellatori della cromatina ATP-dipendente con funzioni principalmente repressive è ad oggi quasi del tutto oscuro.

ISWI è la subunità catalitica di numerosi complessi di rimodellamento ATP-dipendente eucariotici altamente conservati dal punto di vista evolutivo (Figura 1) che svolgono un ruolo fondamentale nella repressione della trascrizione, nella condensazione dei cromosomi e nella replicazione e riparazione del DNA (Corona DFV, Tamkun JW, 2004). Non è ad oggi noto se i rimodellatori della cromatina ATP-dipendenti coinvolti nella repressione trascrizionale costituiscano elementi chiave nella patogenesi del cancro, sebbene vi siano alcune evidenze sperimentali che ne suggeriscano un possibile coinvolgimento.

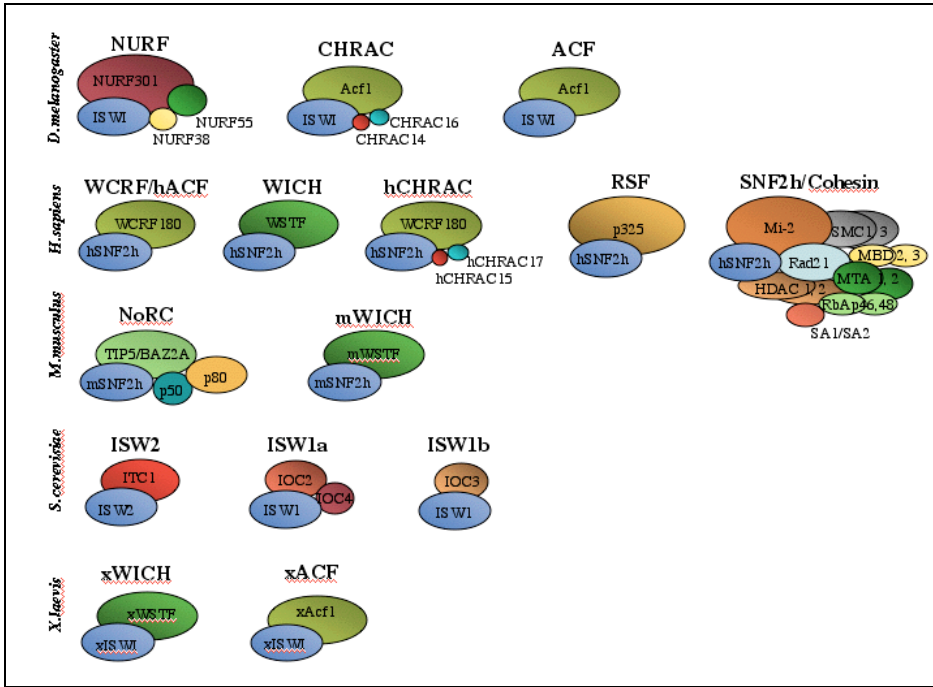


Figura 1. Complessi proteici contenenti ISWI. ISWI è la subunità catalitica di molti complessi di rimodellamento ATP dipendente eucariotici altamente conservati dal punto di vista evolutivo. (Adattata da Corona et Al. BBA 2004).

È noto che la perdita della funzione di ISWI, in *Drosophila melanogaster*, altera drasticamente la struttura complessiva dei cromosomi politenici in interfase, facendoli apparire altamente decondensati (Figura 2) (Deuring R, et al., 2000). La perdita di funzione di ISWI altera inoltre la struttura dei cromosomi mitotici dei neuroblasti larvali di *Drosophila melanogaster* e compromette in modo grave la condensazione mitotica e l'organizzazione del fuso mitotico durante le prime divisioni embrionali, in *Drosophila* (Corona DF, et al., 2007). Questi dati indicano che ISWI possa rivestire un ruolo importante nell'organizzazione globale delle strutture di ordine superiore della cromatina *in vivo* (Corona DFV, Tamkun JW, 2004).

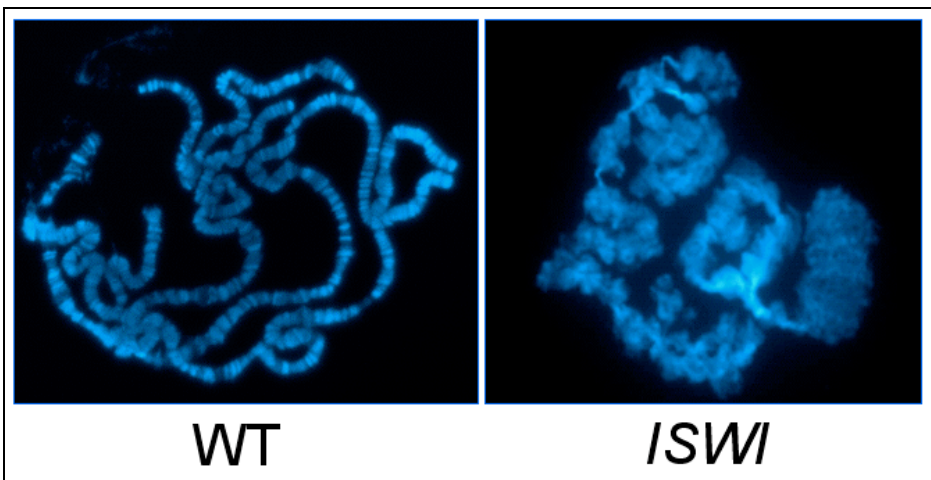


Figura 2. La perdita di ISWI produce difetti nella condensazione dei cromosomi. Cromosomi politenici estratti da ghiandole salivari selvatiche da larve prelevate 14 giorni dopo la deposizione (WT) sono confrontate con cromosomi di mutanti *ISWI* da larve di 21 giorni (*ISWI*). Mutanti *ISWI*, nel pannello di destra, rivelano una struttura cromosomica altamente decondensata e disorganizzata se confrontata con larve selvatiche nel pannello di sinistra.

ISWI è associato con centinaia di siti eucromatici in cromosomi politenici di *Drosophila melanogaster* (Deuring R, et al., 2000). Studi di espressione genica hanno inoltre dimostrato che ISWI svolge un ruolo generale sulla repressione trascrizionale (Corona DFV, Tamkun JW, 2004). Questi dati suggeriscono che i difetti di condensazione dei cromosomi contribuiscono alla derepressione dell'espressione genica osservata nei mutanti *ISWI*.

All'interno del laboratorio in cui ho svolto la tesi, con il fine di capire se ISWI potesse svolgere un ruolo nel controllo del ciclo cellulare, sono state analizzate popolazioni cellulari isolate *ex vivo* da dischi immaginali dell'occhio e da cervelli di larve al terzo stadio di *Drosophila melanogaster*, ottenute da larve selvatiche e mutanti per *ISWI*. Le cellule isolate sono state analizzate per citofluorometria per ottenere profili di ciclo cellulare (Collesano M, et al., dati non pubblicati). Questa analisi ha rilevato forti differenze nei profili di ciclo cellulare tra larve selvatiche e mutanti per *ISWI*. Questi dati suggeriscono fortemente che il fattore di rimodellamento ATP-dipendente ISWI possa svolgere, direttamente od indirettamente, un ruolo importante nel controllo della progressione del ciclo cellulare e nel differenziamento cellulare.

In *Drosophila melanogaster* il complesso NURF, uno dei complessi di rimodellamento della cromatina ATP-dipendente contenente ISWI, è essenziale nell'attivazione trascrizionale dei geni *hsp70* ed *hsp26* (Badenhorst P, et al., 2002), geni tradizionalmente coinvolti nei pathway di regolazione dei processi apoptotici. Questo dato suggerisce un possibile ruolo di ISWI nei processi che regolano i fenomeni apoptotici. È stato inoltre riportato che il complesso di rimodellamento NURF è richiesto per una corretta espressione dei geni omeotici (Badenhorst P, et al., 2002), geni coinvolti nei processi di differenziamento cellulare. Inoltre, mutanti nelle subunità del complesso NURF manifestano trasformazione neoplastica delle cellule dell'emolinfa larvale tale da promuovere la formazione di tumori melanotici (Badenhorst P, et al., 2002). Questo dato suggerisce un ruolo di ISWI nella trasformazione neoplastica.

In un recente studio il rinnovamento staminale delle cellule della linea germinale dell'ovario di *Drosophila melanogaster* risulta dipendente da ISWI (Xi R, Xie T, 2005). Inoltre, è stato riportato, che mutazioni in *isw-1*, omologo in *Caenorhabditis elegans* di ISWI di *Drosophila melanogaster*, siano in grado di sopprimere fenotipi derivanti dall'iperattivazione del pathway dell'oncogene *Ras* (Andersen EC, et al., 2006). È possibile ipotizzare che farmaci antagonisti dell'attività di ISWI potrebbero essere utilizzati come antitumorali in forme cancerose caratterizzati dall'iperattivazione del pathway di *Ras*, una delle caratteristiche più comuni tra le varie forme di tumore.

ISWI INTERAGISCE GENETICAMENTE CON DIVERSI FATTORI CELLULARI

Al fine di identificare nuovi regolatori del rimodellatore della cromatina ATP-dipendente ISWI, nel nostro laboratorio è stato condotto uno screening genetico che ha permesso l'isolamento di diversi fattori operanti in concerto con ISWI che erano sfuggiti a precedenti analisi biochimiche (Burgio G, et al., 2008). Il sistema utilizzato in questo screening è l'occhio di *Drosophila*, già utilizzato in passato per isolare componenti di diversi pathway biochimici, ad esempio il pathway dell'oncogene *Ras* è stato identificato con questo approccio (Karim FD; et al., 1996). L'occhio di *Drosophila* in quanto tessuto nervoso, esprime il 98% dei geni ed è un organo indispensabile che bene si presta a studiare ISWI che è un gene essenziale (Corona DFV, et al., 2004).

Questo screening genetico è stato condotto utilizzando un saggio *in vivo* di mis-espressione specifica nei territori dell'occhio di una forma enzimaticamente inattiva di ISWI (ISWI^{K159R}) non in grado di idrolizzare ATP, che funziona da dominante negativo su ISWI selvatico. La mis-espressione di ISWI^{K159R} nell'occhio determina un occhio danneggiato, con una morfologia alterata se confrontata alla morfologia di un occhio selvatico (Burgio G, et al., 2008). Il rationale dello screening è stato il seguente: se mutazioni in un gene peggiorano o migliorano il fenotipo dell'occhio provocato dalla parziale perdita di attività di ISWI, in seguito a mis-espressione di ISWI^{K159R}, il prodotto di quel gene potrebbe essere coinvolto negli stessi processi biologici in cui è coinvolto ISWI.

Questo screening genetico ha permesso l'isolamento di modificatori covalenti della cromatina quale il complesso di deacetilasi istonica SIN3A/RPD3 e la poli-ADP-ribosio-polimerasi PARP (Burgio G., et al., 2008; Sala A, et al., 2008). Il complesso di deacetilasi istonica SIN3A/RPD3 e la PARP hanno omologhi funzionali umani che rivestono ruoli chiave nella trasformazione oncogenica e nei processi apoptotici (Minucci S, Pelicci PG, 2006; Roberts CWM and Orkin S H, 2004; Haince JF, et al., 2005), suggerendo importanti interazioni funzionali tra il rimodellatore della cromatina ATP-dipendente ISWI e specifiche modifiche epigenetiche della cromatina quali l'acetilazione e la poli-ADP-ribosilazione di specifici componenti della cromatina.

Nonostante il successo di questo screening, non sono stati trovati mutanti che sopprimevano il fenotipo provocato dalla mis-espressione della forma enzimaticamente inattiva di ISWI (Burgio G, et al., 2008). La mis-espressione di ISWI^{K159R} nei territori di formazione dell'occhio causa dei difetti morfologici che si aggravano se viene introdotto un allele nullo di *ISWI*, indicando che il fenotipo analizzato è specifico per la perdita di funzione di ISWI (Burgio G, et al., 2008). Ciò non di meno, non si può escludere formalmente che la mis-espressione di ISWI^{K159R} nei territori dell'occhio possa introdurre alcuni effetti aspecifici dominanti, difficilmente revertibili, che compromettono la morfogenesi dell'occhio ed impediscono l'isolamento di mutazioni soppressive.

Dati prodotti nel laboratorio in cui ho svolto la mia tesi (Sala A, et al., 2008) hanno dimostrato che i cromosomi che mis-esprimono ISWI^{K159R} sono legati da un largo eccesso di questa proteina enzimaticamente inattiva (confrontare Figura 3B e 3D).

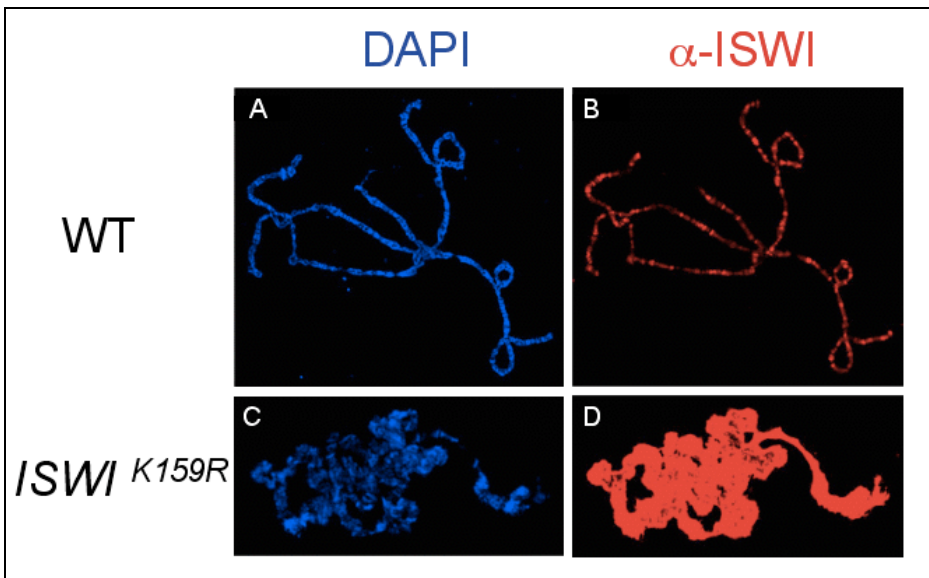


Figura 3. Effetti della mis-espressione di ISWI^{K159R} su cromosomi politenici. (A) colorazione DAPI ed (B) immunofluorescenza contro ISWI su larve selvatiche. (C) colorazione DAPI ed (D) immunofluorescenza contro ISWI in ghiandole che esprimono la forma enzimaticamente inattiva ISWI^{K159R}. La mis-espressione di ISWI^{K159R} porta ad una decondensazione generale della cromatina (confronta pannelli A e C) (Sala A, et al, 2008) Confrontando il pannello B con il pannello D si nota un

maggiore caricamento di ISWI^{K159R} sui cromosomi che esprimono la forma enzimaticamente inattiva rispetto al selvatico.

Il caricamento eccessivo della proteina ISWI^{K159R} sulla cromatina oltre a determinare decondensazione cromosomica, probabilmente determina difetti nella trascrizione e nella replicazione del DNA aspecifici. Inoltre, è probabile che la forma enzimaticamente inattiva di ISWI sia in grado di sequestrare la maggior parte delle subunità dei complessi in cui ISWI si complessa per svolgere le sue funzioni, spostando l'equilibrio di formazione dei complessi verso forme funzionalmente inattive. Inoltre, è plausibile che l'alterato equilibrio di formazione dei complessi perturbi ulteriormente gli equilibri di formazione di altri complessi multiproteici, differenti da quelli contenenti ISWI stessa, ma che condividono alcune subunità. Se ciò fosse vero, il fenotipo dell'occhio misprime la forma enzimaticamente inattiva di ISWI potrebbe essere dovuto in parte ad effetti aspecifici difficilmente reversibili

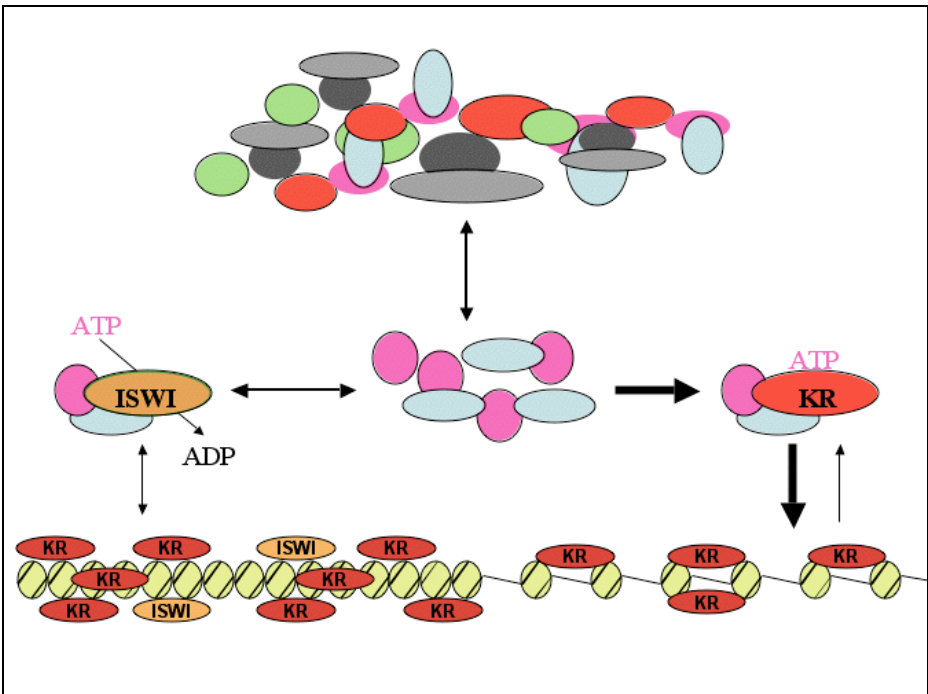


Figura 4. ISWI^{K159R} altera l'equilibrio di formazione dei complessi.

OBIETTIVI

Obiettivo del mio progetto di dottorato è stato chiarire il ruolo del rimodellatore della cromatina ISWI nell'omeostasi cellulare e nei processi di trasformazione oncogenica utilizzando la *Drosophila melanogaster* come sistema modello per identificare possibili pathway biochimici alla base di fenomeni di trasformazione cellulare in cui la proteina ISWI possa essere coinvolta. Una aumentata conoscenza del network regolativo della proteina ISWI può infatti chiarire il suo eventuale ruolo nella regolazione del ciclo cellulare.

Con questo obiettivo in mente ho voluto condurre uno screening genetico al fine di isolare soppressori della perdita di funzione di ISWI, per completare l'analisi delle proteine che regolano o sono regolate da ISWI. L'analisi dei mutanti mi consentirà di comprendere come le reazioni di rimodellamento della cromatina catalizzate da ISWI si integrino nei processi di regolazione del ciclo cellulare ed eventualmente nei processi di trasformazione oncogenica. Inoltre, i dati dello screening saranno importanti in quanto è altamente probabile che i fattori in grado di sopprimere il fenotipo provocato dalla perdita di funzione di ISWI siano di natura diversa rispetto a quelli in grado di peggiorarne il fenotipo. In quest'ottica, una aumentata conoscenza del network funzionale di ISWI potrebbe dare in futuro nuovi possibili markers per la diagnosi del cancro.

MATERIALI E METODI

LINEE DI DROSOPHILA:

Le linee di *Drosophila melanogaster* sono state cresciute su un terreno di coltura K12 (Genovese SI e Corona DF, 2007) a 25°C.

Le descrizioni e le referenze di tutte le linee di mosche in questa tesi, se non diversamente scritto, possono essere trovate all'interno della banca dati informatica Flybase (<http://flybase.org>). I genotipi di tutte le mosche contenenti inserzioni EGUF sono descritti in RS Stowers and TL Schwarz, 1999. Le linee di mosche contenenti la fonte di trasposasi ed il trasposone Piggy-Bac sono descritte in Horn C, et al., 2003.

Le collezioni di linee *EP* utilizzate in questa tesi sono state fornite da Exelixis (<http://drosophila.med.harvard.edu/>) e corrispondono ad inserzioni sul terzo cromosoma. Le collezioni di delezioni isogenetiche (DEF) utilizzate in questa tesi sono state fornite da Exelixis (<http://drosophila.med.harvard.edu/>) e corrispondono a delezioni del terzo e del quarto cromosoma. Gli alleli di geni del terzo cromosoma utilizzate in questa tesi sono state fornite da Exelixis (<http://drosophila.med.harvard.edu/>).

Le analisi di iPCR sono state eseguite ad opera di Eric P. Spana, PhD, Executive Director, Model System Genomics, Department of Biology Box 90338, Lab: Room 4305, Office: Room 4315, French Family Science Center, Science Drive, Duke University, Durham, NC 27708, phone: 919-613-8208; fax: 919-613-8177, email: spana@duke.edu, www.biology.duke.edu/model-system).

INCROCI PER GENERARE LE MOSCHE CONTROLLO:

Per generare l'occhio controllo ISWI-EGUF 5 maschi $yw, pBac\{3xP3-EYFP, p-tTA-K10\}; P\{neoFRT\}42D, ISWI^2, sp/SM5, Cy, sp$ sono incrociati con 5 vergini $yw; P\{neoFRT\}42D, GMR-hid2R, CL2R, y^+/CyO; EGUF$. Nella progenie F_1 vengono selezionati come classe sperimentale i maschi $yw; P\{neoFRT\}42D, ISWI^2, sp/P\{neoFRT\}42D, GMR-hid2R, CL2R, y^+; EGUF/+$.

Per generare l'occhio controllo WT-EGUF 5 maschi $yw; P\{neoFRT\}42D$ sono incrociati con 5 vergini $yw; P\{neoFRT\}42D, GMR-hid2R, CL2R, y^+/CyO; EGUF$. Nella progenie F_1 vengono selezionati come classe sperimentale sia i maschi che le femmine $yw; P\{neoFRT\}42D/P\{neoFRT\}42D, GMR-hid2R, CL2R, y^+; EGUF/+$.

Per generare l'occhio controllo ISWI-EGUF con all'interno una copia del gene *ISWI* enzimaticamente inattivo che funziona da dominante negativo ($ISWI^{K159R}$) 5 vergini $yw, pBac\{3xP3-EYFP, p-tTA-K10\}; P\{neoFRT\}42D, ISWI^2, sp/SM5, Cy, sp$ sono incrociate con 5 maschi $yw; P\{w^+, UAS GALhsp70:ISWI^{K159R}\}/TM3, Sb$. Nella progenie F_1 vengono selezionati 5 maschi $yw; P\{neoFRT\}42D, ISWI^2, sp/+; P\{w^+, UAS GALhsp70:ISWI^{K159R}\}/+$ e sono incrociati con 5 vergini $yw; P\{neoFRT\}42D, GMR-hid2R, CL2R, y^+/CyO; EGUF$. Nella progenie F_2 vengono selezionati come classe sperimentale i maschi $yw; P\{neoFRT\}42D, ISWI^2, sp/P\{neoFRT\}42D, GMR-hid2R, CL2R, y^+; EGUF/P\{w^+, UAS GALhsp70:ISWI^{K159R}\}$.

Per generare l'occhio controllo *brm*-EGUF 5 maschi $yw; P\{neoFRT\}79B, brm^2/TM6, Hu, Tb$ sono incrociati con 5 vergini $yw; EGUF/CyO; P\{neoFRT\}79B, GMR-hid3R, CL3R, y^+/TM3, Sb$. Nella progenie F_1 vengono selezionati come classe sperimentale sia i maschi che le femmine $yw; EGUF/+; P\{neoFRT\}79B, brm^2/P\{neoFRT\}79B, GMR-hid3R, CL3R, y^+$.

Per generare l'occhio controllo *kis*-EGUF 5 maschi $yw; P\{neoFRT\}40A, kis^1/CyO$ sono incrociati con 5 vergini $yw; P\{neoFRT\}40A, GMR-hid2L, CL2L, y^+/CyO; EGUF$. Nella progenie F_1 vengono selezionati come classe sperimentale sia i maschi che le

femmine yw; P{neoFRT}40A,kis¹/P{neoFRT}40A,GMR-hid2L,CL2L,y⁺;EGUF/+.

Per generare l'occhio controllo ISWI-EGUF in mosche portanti una copia ectopica di ISWI selvatico 5 vergini yw,pBac{3xP3-EYFP,p-tTA-K10};P{neoFRT}42D,ISWI²,sp/SM5,Cy,sp sono incrociate con 5 maschi yw;P{w⁺,ISWI}/TM3,Sb. Nella progenie F₁ vengono selezionati 5 maschi yw;P{neoFRT}42D,ISWI²,sp/+;P{w⁺,ISWI}/+ e sono incrociati con 5 vergini yw;P{neoFRT}42D,GMR-hid2R,CL2R,y⁺/CyO;EGUF. Nella progenie F₂ vengono selezionati come classe sperimentale sia i maschi che le femmine yw;P{neoFRT}42D,ISWI²,sp/P{neoFRT}42D,GMR-hid2R,CL2R,y⁺;EGUF/P{w⁺,ISWI}.

Per generare l'occhio controllo ISWI-EGUF in mosche portanti una mutazione acf1 5 vergini yw,pBac{3xP3-EYFP,p-tTA-K10};P{neoFRT}42D,ISWI²,sp/SM5,Cy,sp sono incrociate con 5 maschi yw;acf1/TM3,Sb. Nella progenie F₁ vengono selezionati 5 maschi yw;P{neoFRT}42D,ISWI²,sp/+;acf1/+ e sono incrociati con 5 vergini yw;P{neoFRT}42D,GMR-hid2R,CL2R,y⁺/CyO;EGUF. Nella progenie F₂ vengono selezionati come classe sperimentale sia i maschi che le femmine yw;P{neoFRT}42D,ISWI²,sp/P{neoFRT}42D,GMR-hid2R,CL2R,y⁺;EGUF/acf1.

Per generare l'occhio controllo ISWI-EGUF in mosche portanti una mutazione nurf301 5 vergini yw,pBac{3xP3-EYFP,p-tTA-K10};P{neoFRT}42D,ISWI²,sp/SM5,Cy,sp sono incrociate con 5 maschi yw;nurf301/TM3,Sb. Nella progenie F₁ vengono selezionati 5 maschi yw;P{neoFRT}42D,ISWI²,sp/+;nurf301/+ e sono incrociati con 5 vergini yw;P{neoFRT}42D,GMR-hid2R,CL2R,y⁺/CyO;EGUF. Nella progenie F₂ vengono selezionati come classe sperimentale sia i maschi che le femmine yw;P{neoFRT}42D,ISWI²,sp/P{neoFRT}42D,GMR-hid2R,CL2R,y⁺;EGUF/nurf301.

Per generare l'occhio controllo ISWI-EGUF in mosche portanti un allele scelto di un gene mutato sul terzo cromosoma 5 vergini yw,pBac{3xP3-EYFP,p-tTA-K10};P{neoFRT}42D,ISWI²,sp/SM5,Cy,sp sono incrociate con 5 maschi portanti l'allele. Nella progenie F₁ vengono selezionati 5 maschi yw;P{neoFRT}42D,ISWI²,sp/+; allele/+ e sono incrociati con 5 vergini yw;P{neoFRT}42D,GMR-

hid2R,CL2R,y⁺/CyO;EGUF. Nella progenie F₂ vengono selezionati come classe sperimentale sia i maschi che le femmine *yw;P{neoFRT}42D,ISWI²,sp/P{neoFRT}42D,GMR-hid2R,CL2R,y⁺;EGUF/allele*. Le linee di mosche contenenti gli alleli utilizzati in questa analisi sono le seguenti: per il gene *cpo* le linee di mosche d00497, d03424, fo2000, f05989 per il gene *effete* le linee di mosche d00904, e0195, per il gene *HSR ω* la linea di mosche e01850, per il gene *mbf1* le linee di mosche f07605, f05959, per il gene *squid* le linee di mosche c04803, e01416, f01931, per il gene *string* le linee di mosche c05571, d4407, per il gene *tramtrack* le linee di mosche c00547, d02388, f00319.

SCREENING GENETICO:

Per identificare un interattore la classe sperimentale è stata confrontata con la classe controllo. Se più del 50% della classe sperimentale presentava un occhio più ridotto della classe controllo la mutazione isolata è stata considerata un enhancer; se più del 50% della classe sperimentale presentava un occhio meno ridotto della classe controllo la mutazione isolata è stata considerata un soppressore. Generalmente la penetranza dei fenotipi è del 100%.

Per lo screening genetico utilizzando linee EP 5 vergini $yw, pBac\{3xP3-EYFP, p-tTA-K10\}; P\{neoFRT\}42D, ISWI^2, sp/SM5, Cy, sp$ sono incrociate con 5 maschi EP. Nella progenie F₁ vengono selezionati 5 maschi $yw; P\{neoFRT\}42D, ISWI^2, sp/+; EP/+$ e sono incrociati con 5 vergini $yw; P\{neoFRT\}42D, GMR-hid2R, CL2R, y^+/CyO; EGUF$. Nella progenie F₁ vengono selezionati come classe sperimentale sia i maschi che le femmine $yw; P\{neoFRT\}42D, ISWI^2, sp/P\{neoFRT\}42D, GMR-hid2R, CL2R, y^+; EGUF/EP$. Sono considerati enhancer le linee la cui classe sperimentale presenta occhi più danneggiati degli occhi controllo ISWI-EGUF. Sono considerati soppressori le linee la cui classe sperimentale presenta occhi meno danneggiati degli occhi controllo ISWI-EGUF.

Per lo screening genetico utilizzando la collezione di delezioni isogenetiche sul terzo cromosoma 5 vergini $yw, pBac\{3xP3-EYFP, p-tTA-K10\}; P\{neoFRT\}42D, ISWI^2, sp/SM5, Cy, sp$ sono incrociate con 5 maschi DEF. Nella progenie F₁ vengono selezionati i maschi $yw; P\{neoFRT\}42D, ISWI^2, sp/+; DEF/+$ e sono incrociati con 5 vergini $yw; P\{neoFRT\}42D, GMR-hid2R, CL2R, y^+/CyO; EGUF$. Nella progenie F₂ vengono selezionati come classe sperimentale sia i maschi che le femmine $yw; P\{neoFRT\}42D, ISWI^2, sp/P\{neoFRT\}42D, GMR-hid2R, CL2R, y^+; EGUF/DEF$. Sono considerati enhancer le linee la cui classe sperimentale presenta occhi più danneggiati degli occhi controllo ISWI-EGUF. Sono considerati soppressori le linee la cui classe sperimentale presenta occhi meno danneggiati degli occhi controllo ISWI-EGUF.

Per lo screening genetico utilizzando collezione di delezioni isogenetiche sul quarto cromosoma 5 vergini $yw, pBac\{3xP3-EYFP, p-tTA-K10\}; P\{neoFRT\}42D, ISWI^2, sp/SM5, Cy, sp$ sono incrociate con

maschi *DEF*. Nella progenie F_1 vengono selezionati i maschi $yw;P\{neoFRT\}42D,ISWI^2,sp/+;DEF/+$ e sono incrociati con 5 vergini $yw;P\{neoFRT\}42D,GMR-hid2R,CL2R,y^+/CyO;EGUF$. Nella progenie F_2 vengono selezionati come classe sperimentale sia i maschi che le femmine $yw;P\{neoFRT\}42D,ISWI^2,sp/P\{neoFRT\}42D,GMR-hid2R,CL2R,y^+;EGUF/+;DEF/+$. Sono considerati enhancer le linee la cui classe sperimentale presenta occhi più danneggiati degli occhi controllo ISWI-EGUF. Sono considerati soppressori le linee la cui classe sperimentale presenta occhi meno danneggiati degli occhi controllo ISWI-EGUF.

Per lo screening genetico utilizzando la mobilitazione di un trasposone PBac 20 vergini $yw,pBac\{3xP3-EYFP,p-tTA-K10\};P\{neoFRT\}42D,ISWI^2,sp/SM5,Cy,sp$ sono incrociate con 20 maschi $pHer\{3xP3-ECFP,ctub-piggyBacK10\}^a$. Nella progenie F_1 vengono selezionati i maschi $yw,pBac\{3xP3-EYFP,p-tTA-K10\};P\{neoFRT\}42D,ISWI^2,sp/pHer\{3xP3-ECFP,ctub-piggyBacK10\}^a$. I singoli maschi vengono incrociati ognuno con 3 vergini w1118. Nella progenie F_2 vengono selezionati i maschi $P\{neoFRT\}42D,ISWI^2,sp/pBac\{3xP3-EYFP,p-tTA-K10\}$ (genotipo secondo cromosoma mutagenizzato) e $P\{neoFRT\}42D,ISWI^2,sp/+;pBac\{3xP3-EYFP,p-tTA-K10\}/+$ (genotipo terzo cromosoma mutagenizzato), indistinguibili dal punto di vista fenotipo. I singoli maschi vengono incrociati ognuno con 3 vergini $yw;P\{neoFRT\}42D,GMR-hid2R,CL2R,y^+/CyO;EGUF$. Nella progenie F_3 vengono selezionati come classe sperimentale sia i maschi che le femmine $P\{neoFRT\}42D,GMR-hid2R,CL2R,y^+/P\{neoFRT\}42D,ISWI^2,pBac\{3xP3-EYFP,p-tTA-K10\},sp;EGUF/+$ (nel caso del genotipo secondo cromosoma mutagenizzato) oppure $yw;P\{neoFRT\}42D,GMR-hid2R,CL2R,y^+/P\{neoFRT\}42D,ISWI^2,sp;EGUF/pBac\{3xP3-EYFP,p-tTA-K10\}$ (nel caso del genotipo terzo cromosoma mutagenizzato). Sono considerati enhancer le linee la cui classe sperimentale presenta occhi più danneggiati degli occhi controllo ISWI-EGUF. Sono considerati soppressori le linee la cui classe sperimentale presenta occhi meno danneggiati degli occhi controllo ISWI-EGUF.

Nel caso la classe sperimentale avesse un fenotipo interagente, sia enhancer che soppressore, il tipo di interazione verrebbe ritestata. Nel qual caso, 5 maschi $P\{neoFRT\}42D,GMR-hid2R,CL2R,y^+/P\{neoFRT\}42D,ISWI^2, pBac\{3xP3-EYFP,p-tTA-$

K10}sp;EGUF/+ (nel caso del genotipo secondo cromosoma mutagenizzato) oppure *yw*;P{neoFRT}42D,GMR-*hid2R,CL2R,y*⁺/P{neoFRT}42D,ISW²,sp;EGUF/pBac{3xP3-EYFP,p-tTA-K10} (nel caso del genotipo terzo cromosoma mutagenizzato) sono incrociati con 5 vergini *yw*;P{neoFRT}42D,GMR-*hid2R,CL2R,y*⁺/CyO;EGUF. Nella progenie F₄ vengono selezionati come classe sperimentale sia i maschi che le femmine P{neoFRT}42D,GMR-*hid2R,CL2R,y*⁺/P{neoFRT}42D,ISW²,pBac{3xP3-EYFP,p-tTA-K10}sp;EGUF/+ (nel caso del genotipo secondo cromosoma mutagenizzato) oppure *yw*;P{neoFRT}42D,GMR-*hid2R,CL2R,y*⁺/P{neoFRT}42D,ISW²,sp;EGUF/pBac{3xP3-EYFP,p-tTA-K10} (nel caso del genotipo terzo cromosoma mutagenizzato). Nel caso fosse confermato che la classe sperimentale abbia un fenotipo interagente, sia enhancer che soppressore, la mutazione viene bilanciata per creare una linea di mosche. Nel qual caso, 5 maschi P{neoFRT}42D,GMR-*hid2R,CL2R,y*⁺/P{neoFRT}42D,ISW²,pBac{3xP3-EYFP,p-tTA-K10}sp;EGUF/+ (nel caso del genotipo secondo cromosoma mutagenizzato) oppure *yw*;P{neoFRT}42D,GMR-*hid2R,CL2R,y*⁺/P{neoFRT}42D,ISW²,sp;EGUF/pBac{3xP3-EYFP,p-tTA-K10} (nel caso del genotipo terzo cromosoma mutagenizzato) sono incrociati con 5 vergini *yw*;P{neoFRT}42D,ISW²,sp/T(2:3)CyO;TM6B,Hu,Tb. Nella progenie F₅ vengono selezionati sia i maschi che le vergini *yw*;P{neoFRT}42D,ISW²,pBac{3xP3-EYFP,p-tTA-K10}sp/T(2:3)CyO;TM6B,Hu,Tb (nel caso del genotipo secondo cromosoma mutagenizzato) ed incrociati tra di loro per creare una linea di mosche, oppure *yw*;P{neoFRT}42D,ISW²,sp;pBac{3xP3-EYFP,p-tTA-K10}/T(2:3)CyO;TM6B,Hu,Tb (nel caso del genotipo terzo cromosoma mutagenizzato) ed incrociati tra di loro per creare una linea di mosche in F₆.

SCREENING SECONDARI:

Gli enhancer isolati dall'esame della collezione di delezioni sono stati incrociati con mosche portanti una inserzione Ey-GAL4 per dare una colorazione di background all'occhio. Questo ha agevolato l'analisi di una preesistente condizione di disorganizzazione degli ocelli, difficile da analizzare se il background dell'occhio fosse stato bianco. Sono stati considerati veri interattori solo quelli che per sé non avessero disorganizzazione degli ocelli. A tal fine 5 vergini $P\{w^+, ey-GAL4\}$ sono incrociate con 5 maschi *DEF*. Nella progenie F_1 vengono selezionati come classe sperimentale sia i maschi che le femmine $P\{w^+, ey-GAL4\}/+; DEF/+$.

I soppressori isolati dall'esame della collezione di delezioni sono stati incrociati con mosche portanti una inserzione GMR-hid per controllare se le delezioni per sé potessero funzionare da soppressori dell'overespressione dell'hid. Sono stati considerati veri interattori solo quelli che per sé non fossero in grado di revertire la distruzione dell'occhio operata dal transgene GMR-hid. A tal fine 5 vergini $yw; P\{neoFRT\}42D, GMR-hid2R, CL2R, y^+/CyO; EGUF$ sono incrociate con 5 maschi *DEF*. Nella progenie F_1 vengono selezionati come classe sperimentale sia i maschi che le femmine $P\{neoFRT\}42D, GMR-hid2R, CL2R, y^+/+; EGUF/DEF$ nel caso la delezione sia sul terzo cromosoma, e $P\{neoFRT\}42D, GMR-hid2R, CL2R, y^+/+; EGUF/+; DEF/+$ nel caso la delezione sia sul quarto cromosoma.

Gli enhancer isolati dall'esame delle mutazioni generate tramite il salto del trasposone Pbac cadute sul terzo cromosoma o sul braccio 2L sono stati incrociati con mosche portanti una inserzione Ey-GAL4 per dare una colorazione di background all'occhio. Questo ha agevolato l'analisi di una preesistente condizione di disorganizzazione degli ocelli, difficile da analizzare se il background dell'occhio fosse stato bianco. Sono stati considerati veri interattori solo quelli che per sé non avessero disorganizzazione degli ocelli. A tal fine 5 vergini $P\{w^+, ey-GAL4\}$ sono incrociate con 5 maschi $yw; P\{neoFRT\}42D, ISWI^2, pBac\{3xP3-EYFP, p-tTA-K10\}sp/T(2:3), Cy, Hu, Tb$ (nel caso del genotipo secondo cromosoma mutagenizzato) oppure $yw; P\{neoFRT\}42D, ISWI^2, sp; pBac\{3xP3-EYFP, p-tTA-K10\}T(2:3), Cy, Hu, Tb$ (nel caso del genotipo terzo cromosoma

mutagenizzato). Nella progenie F_1 vengono selezionati come classe sperimentale sia i maschi che le femmine $P\{neoFRT\}42D, ISWI^2, pBac\{3xP3-EYFP, p-tTA-K10\}sp/P\{w^+, ey-GAL4\}$ (nel caso del genotipo secondo cromosoma mutagenizzato) oppure $P\{neoFRT\}42D, ISWI^2, sp/P\{w^+, ey-GAL4\}; pBac\{3xP3-EYFP, p-tTA-K10\}/+$ (nel caso del genotipo terzo cromosoma mutagenizzato)

Gli enhancer isolati dall'esame delle mutazioni generate tramite il salto del trasposone Pbac cadute sul braccio 2R sono state analizzate in modo differente dalle precedenti. Le mutazioni su questo braccio hanno ricombinato insieme all'allele $ISWI^2$ ed il loro effetto è svolto in condizione di omozigosi anziché di eterozigosi. Pertanto risultano interagenti anche mutazioni recessive. Per testare questi interattori è stato inserito all'interno della classe sperimentale un transgene esprime la proteina selvatica ISWI. Sono stati considerati veri interattori solo quelli che dopo l'inserzione del transgene fossero in grado di revertire ad un occhio selvatico. Come atteso, molti interattori di questa classe sono risultati falsi positivi, in quanto molte mutazioni in omozigosi possono dare per sé un fenotipo differente dal selvatico.

A tal fine 5 maschi $yw; P\{neoFRT\}42D, ISWI^2, pBac\{3xP3-EYFP, p-tTA-K10\}sp/T(2:3), Cy, Hu, Tb$ sono incrociati con 5 vergini $yw; P\{w^+, ISWI\}/TM3, Sb$. Nella progenie F_1 vengono selezionati 5 maschi $yw; P\{neoFRT\}42D, ISWI^2, pBac\{3xP3-EYFP, p-tTA-K10\}, sp/+; P\{w^+, ISWI\}/+$ e sono incrociati con 5 vergini $yw; P\{neoFRT\}42D, GMR-hid2R, CL2R, y^+/CyO; EGUF$. Nella progenie F_2 vengono selezionati come classe sperimentale sia i maschi che le femmine $yw; P\{neoFRT\}42D, ISWI^2, pBac\{3xP3-EYFP, p-tTA-K10\}, sp/P\{neoFRT\}42D, GMR-hid2R, CL2R, y^+; EGUF/P\{w^+, ISWI\}$.

I soppressori isolati dall'esame delle mutazioni generate tramite il salto del trasposone Pbac sono caduti tutti sul braccio 2R. Le mutazioni su questo braccio hanno ricombinato insieme all'allele $ISWI^2$ ed il loro effetto è svolto in condizione di omozigosi anziché di eterozigosi. Per testare se effettivamente gli ipotetici interattori fossero reali e non falsi positivi, si è inserito all'interno della classe sperimentale un'ulteriore inserzione contenente il transgene GMR-hid in un'altra posizione cromosomica non in grado di ricombinare tramite il sistema EGUF. Sono stati considerati veri interattori e non falsi positivi quelli non in grado di revertire il fenotipo dell'occhio danneggiato provocato dal transgene GMR-hid per sé.

A tal fine 5 maschi $yw;P\{neoFRT\}42D,ISWI^2,pBac\{3xP3-EYFP,p-tA-K10\};sp/T(2:3),Cy,Hu,Tb$ sono incrociati con 5 vergini $yw;EGUF/CyO;P\{neoFRT\}79B,GMR-hid3R,CL3R,y^+/TM3,Sb$. Nella progenie F_1 vengono selezionati 5 maschi $yw;P\{neoFRT\}42D,ISWI^2,pBac\{3xP3-EYFP,p-tA-K10\};sp/CyO;P\{neoFRT\}79B,GMR-hid3R,CL3R,y^+/+$ e sono incrociati con 5 vergini $yw;P\{neoFRT\}42D,ISWI^2,sp/T(2:3)CyO;TM6B,Hu,Tb$. Nella progenie F_2 vengono selezionati 5 maschi $yw;P\{neoFRT\}42D,ISWI^2,pBac\{3xP3-EYFP,p-tA-K10\};sp;P\{neoFRT\}79B,GMR-hid3R,CL3R,y^+/T(2:3)CyO;TM6B,Hu,Tb$ ed vengono incrociati con 5 vergini $yw;P\{neoFRT\}42D,GMR-hid2R,CL2R,y^+/CyO;EGUF$. Nella progenie F_3 vengono selezionati come classe sperimentale sia i maschi che le femmine $yw;P\{neoFRT\}42D,ISWI^2,pBac\{3xP3-EYFP,p-tA-K10\};sp/P\{neoFRT\}42D,GMR-hid2R,CL2R,y^+;P\{neoFRT\}79B,GMR-hid3R,CL3R,y^+/EGUF$.

Gli enhancer isolati dall'esame della collezione di linee EP sono stati incrociati con mosche portanti una inserzione Ey-GAL4 per verificare :

- 1) nel caso di guadagno di funzione del gene in cui è inserito l'elemento P se l'attivatore trascrizionale GAL4 fosse in grado di indurre l'espressione del gene su cui insiste l'inserzione dell'elemento P e di conseguenza provocare di per sé una disorganizzazione dell'occhio non specifica per l'interazione genetica per ISWI.

- 2) nel caso di perdita di funzione del gene in cui è inserito l'elemento P se la distruzione del gene in cui è inserito l'elemento P fosse in grado di provocare di per sé una disorganizzazione dell'occhio non specifica per l'interazione genetica per ISWI. L'introduzione del transgene Ey-GAL4 in questo caso dona all'occhio una colorazione che agevola l'analisi della morfologia dell'occhio.

In entrambi i casi sono stati considerati veri interattori solo quelli che non avessero disorganizzazione degli ocelli dopo l'introduzione del transgene Ey-GAL4.

A tal fine 5 vergini $P\{w^+,ey-GAL4\}$ sono incrociate con 5 maschi EP. Nella progenie F_1 vengono selezionati come classe sperimentale sia i maschi che le femmine $P\{w^+,ey-GAL4\}/+;EP/+$.

I soppressori isolati dall'esame della collezione di linee EP sono stati incrociati con mosche portanti una inserzione GMR-hid per controllare se le inserzioni dell'elemento P per sé potessero funzionare da

soppressori dell'overespressione dell'hid. Sono stati considerati veri interattori solo quelli che di per sé non fossero in grado di revertire la distruzione dell'occhio operata dal transgene GMR-hid.

A tal fine 5 vergini $yw;P\{neoFRT\}42D,GMR-hid2R,CL2R,y^+/CyO;EGUF$ sono incrociate con 5 maschi EP . Nella progenie F_1 vengono selezionati come classe sperimentale sia i maschi che le femmine $P\{neoFRT\}42D,GMR-hid2R,CL2R,y^+/+;EGUF/EP$.

RISULTATI

UN SAGGIO *IN VIVO* PER ISOLARE SOPPRESSORI ED ENHANCERS DI ISWI

Al fine di isolare soppressori della funzione di ISWI ho messo a punto una strategia per ridurre la funzione di ISWI, senza ricorrere all'espedito di interferire con la sua funzione *in vivo* utilizzando una forma enzimaticamente inattiva di ISWI. Lo sviluppo di un nuovo saggio *in vivo* deve tenere in considerazione di ridurre i potenziali effetti aspecifici irreversibili dati dalla mis-espressione di ISWI^{K159R} (Figura 4).

Per far ciò, ho generato delle mosche i cui occhi fossero composti esclusivamente da cloni mitotici che avessero perso la funzione di ISWI attraverso l'approccio EGUF (Stowers RS, Schwarz TL, 1999), utilizzando la metodica del mosaicismo per ricombinazione mitotica all'interno dei territori dell'occhio di *Drosophila melanogaster*. In questa tecnica il braccio del cromosoma su cui risiede l'allele nullo *ISWI*² possiede accanto al centromero un sito di ricombinazione *FRT*. Il cromosoma omologo possiede un sito di ricombinazione *FRT* nella stessa posizione citologica, ma possiede anche un transgene che esprime il fattore proapoptotico *hid* sotto il controllo del promotore occhio specifico tardivo *GMR*. In un altro cromosoma sono presenti altri due transgeni. Il primo esprime la proteina Flippasi sotto il controllo di un promotore *UAS*, attivato dal secondo transgene che esprime l'attivatore *GAL4* sotto il controllo del promotore occhio specifico precoce *eyeless* (Stowers RS, Schwarz TL, 1999).

In questo sistema durante la morfogenesi dell'occhio, il promotore *eyeless* fa esprimere in modo tessuto specifico la proteina flippasi, che riconosce i siti omologhi di ricombinazione *FRT*. Quando questo avviene al momento della tetrad durante la mitosi, il braccio del cromosoma che contiene l'allele nullo *ISWI*² ricombina con il braccio contenente il transgene *GMR-hid*, letale occhio specifico. Dopo la ricombinazione si possono ottenere quattro diverse popolazioni cellulari. Tre di queste posseggono almeno una copia del transgene *GMR-hid*, una sola di queste popolazioni possiederà l'allele nullo *ISWI*² in omozigosi (Figura 5).

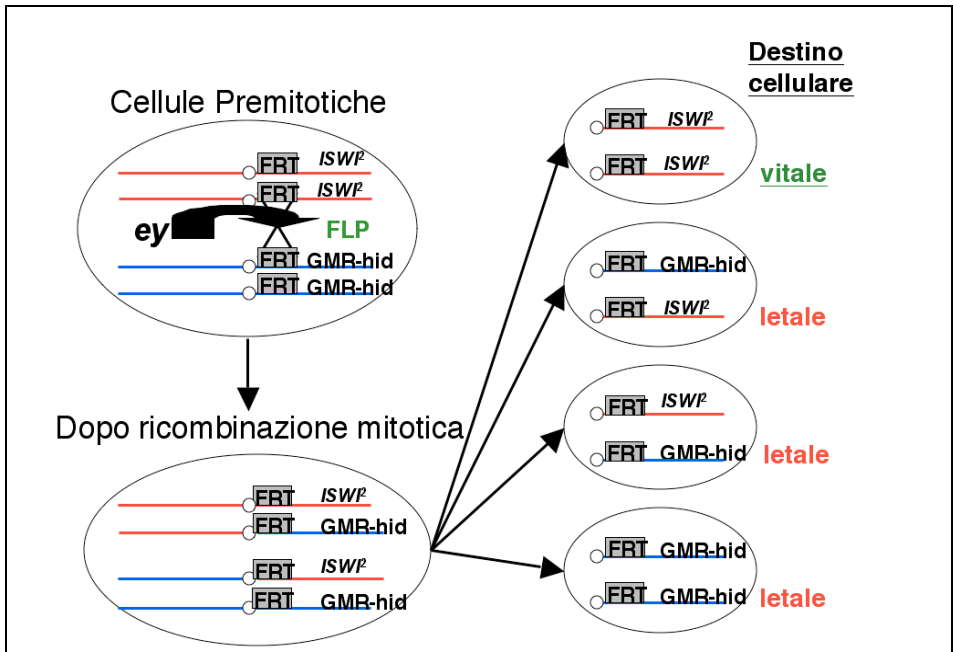


Figura 5. Rappresentazione schematica della generazione di occhi ISWI-EGUF. Dopo ricombinazione mitotica nelle cellule dei dischi immaginali dell'occhio solo una subpopolazione di cellule potrà procedere alla morfogenesi dell'occhio poiché non possiede il transgene letale *GMR-hid*. Nella figura solo le cellule che possiedono l'allele nullo *ISWI²* in omozigosi formeranno l'occhio della mosca adulta. Adattato da Stowers RS and Schwarz TL, 1999.

Dopo la ricombinazione mitotica tutte le cellule che posseggono il *GMR-hid* andranno a morte al momento dell'attivazione del promotore tardivo *GMR* che promuoverà la produzione del fattore proapoptotico *hid*. In tal modo le uniche cellule che formeranno l'occhio della mosca adulta saranno quelle con la mutazione nulla *ISWI²* in omozigosi. Con questa tecnica è possibile generare delle mosche che sono omozigoti per la mutazione di interesse solo nei territori dell'occhio, ma eterozigoti per il resto corpo. In tal modo è possibile studiare *in vivo* nell'occhio di *Drosophila* gli effetti della perdita di funzione di un gene essenziale quale *ISWI*, senza ricorrere all'uso del transgene *ISWI^{K159R}*.

La perdita di funzione di *ISWI* utilizzando questa tecnica di ricombinazione mitotica genera un occhio con delle caratteristiche peculiari (ISWI-EGUF). L'occhio ISWI-EGUF è un occhio di dimensione ridotta i cui ocelli sono altamente disorganizzati. Inoltre è frequente la comparsa di strutture ectopiche quali abbozzi di antenna nei territori di formazione dell'occhio. (Figura 6).



Figura 6: Fenotipo dell'occhio ISWI-EGUF. Il fenotipo dell'occhio ottenuto dalla ricombinazione mitotica dell'allele ISWI² tramite tecnica EGUF, presenta caratteristiche peculiari: un occhio ridotto nelle dimensioni e disorganizzato, variegazione del colore dell'occhio, e spesso perdita di identità cellulare con la comparsa di strutture ectopiche nei territori presunti dell'occhio.

Una interpretazione ragionevole delle caratteristiche dell'occhio ISWI-EGUF suggerisce che l'occhio ridotto di dimensioni e disorganizzato possa essere provocato dalla presenza di morte cellulare e difetti nell'organogenesi. Inoltre, la variegazione di colore dell'occhio suggerisce un'alterata regolazione dell'espressione genica. Infine, la comparsa di strutture ectopiche suggerisce perdita d'identità cellulare e possibili difetti nel differenziamento.

Per testare la specificità del fenotipo ottenuto ho inserito all'interno della mosca sensibilizzata ISWI-EGUF una copia ectopica del gene *ISWI* sotto il controllo del suo promotore fisiologico. Il fenotipo risultante è un occhio morfologicamente indistinguibile dal selvatico (Figura 7F). Questo risultato indica che il fenotipo dell'occhio ISWI-EGUF è specifico per la perdita di funzione di *ISWI*.

Al contrario la presenza di una copia ectopica del gene *ISWI*^{K159R} sotto il controllo del suo promotore non è in grado di revertire il fenotipo ISWI-EGUF al selvatico (Figura 7E). Questo dato indica che il fenotipo dell'occhio ISWI-EGUF è specifico per la perdita della funzione di rimodellamento della cromatina ATP-dipendente di *ISWI* (Figura 7E).

Ho voluto inoltre controllare se il fenotipo ISWI-EGUF fosse dovuto alla perdita di funzione di un generico rimodellatore della cromatina ATP-dipendente o se fosse specifico per la perdita di funzione di *ISWI*. A tal fine, ho utilizzato il sistema EGUF per ridurre l'attività di *brm*, l'omologo in *Drosophila melanogaster* di *SWI2/SNF2* (Becker PB, Hörz W, 2002), e *kis*, un altro fattore di rimodellamento della cromatina ATP-dipendente coinvolto nell'attivazione trascrizionale (Becker PB, Hörz W, 2002). Gli occhi ottenuti hanno caratteristiche distinte da quelle dell'occhio ISWI-EGUF (Figura 7C e 7D, rispettivamente). Nello specifico, l'occhio *brm*-EGUF è un occhio generalmente totalmente mancante, mentre l'occhio *kis*-EGUF è ridotto di dimensione, gli ocelli sono altamente disorganizzati, e presentano vaste aree di necrosi con una superficie lucida che ricorda il fenotipo dato dall'allele *Gla* (Brunner E, et al., 1999). Questi dati indicano che il fenotipo dell'occhio ISWI-EGUF è specifico per la perdita di funzione di *ISWI* e non per la perdita di un generico rimodellatore della cromatina ATP-dipendente.

Ho voluto inoltre saggiare se il fenotipo dell'occhio ISWI-EGUF fosse dovuto ad una parziale perdita di funzione di *ISWI*. A tal fine ho introdotto mutazioni in *acfl* e *nurf301*, che codificano per due interattori fisici di *ISWI* (Corona DFV, Tamkun JW, 2004). Mutazioni in *acfl* e *nurf301* peggiorano il fenotipo dell'occhio ISWI-EGUF (nella figura 7 confrontare 7B con 7G e 7H, rispettivamente). Questo dato indica che il fenotipo osservato nell'occhio ISWI-EGUF è il risultato di una parziale perdita di funzione dell'attività di *ISWI* nell'occhio, in grado di peggiorare se la sua funzione viene ulteriormente compromessa dalla perdita di interattori che lavorano in concerto con

ISWI stessa. Questo risultato indica che ho sviluppato un nuovo saggio *in vivo* in grado di isolare enhancers di ISWI.

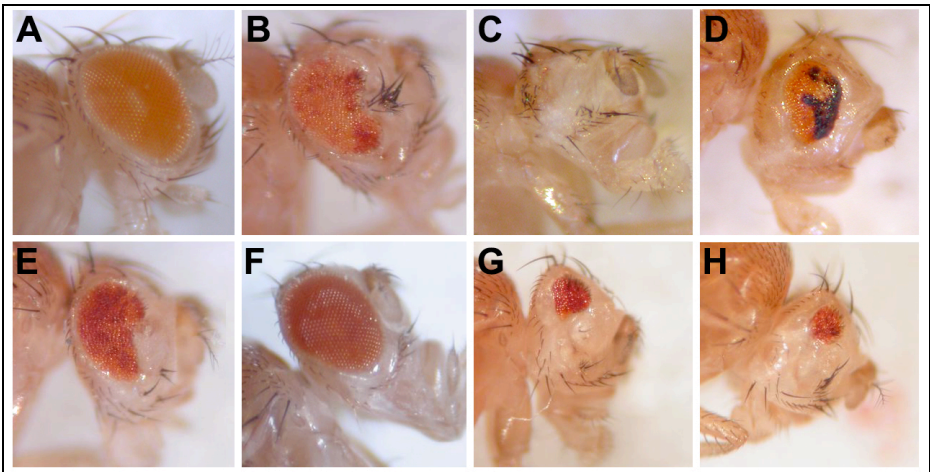


Figura 7. Il fenotipo ISWI-EGUF è specifico per la perdita di funzione di ISWI. La ricombinazione di un cromosoma selvatico è in grado di dare un fenotipo selvatico (A), invece, la ricombinazione di un cromosoma portante la mutazione *ISWI*² dà un fenotipo caratteristico - ISWI-EGUF - (B), distinto dal fenotipo ottenuto dalla ricombinazione di un cromosoma portante la mutazione *brm*² (C) o *kis*¹ (D). Il fenotipo ISWI-EGUF può essere revertito da una copia ectopica funzionale di ISWI (F), ma non da una copia enzimaticamente inattiva (E). Inoltre, il fenotipo ISWI-EGUF può essere aggravato da una mutazione nei geni *acfl* (G) e *nurf301* (H) che codificano per due interattori fisici di ISWI.

SCREENING PER MODIFICATORI DEL FENOTIPO ISWI-EGUF:

La perdita di funzione di ISWI tramite l'approccio EGUF probabilmente è in grado di non generare gli effetti aspecifici sullo sviluppo dell'occhio che ho osservato quando viene mispressa una forma dominante negativa di *ISWI*. Dunque, è probabile che utilizzando il fenotipo ISWI-EGUF io sia in grado di isolare soppressori del fenotipo in esame, oltre che enhancers.

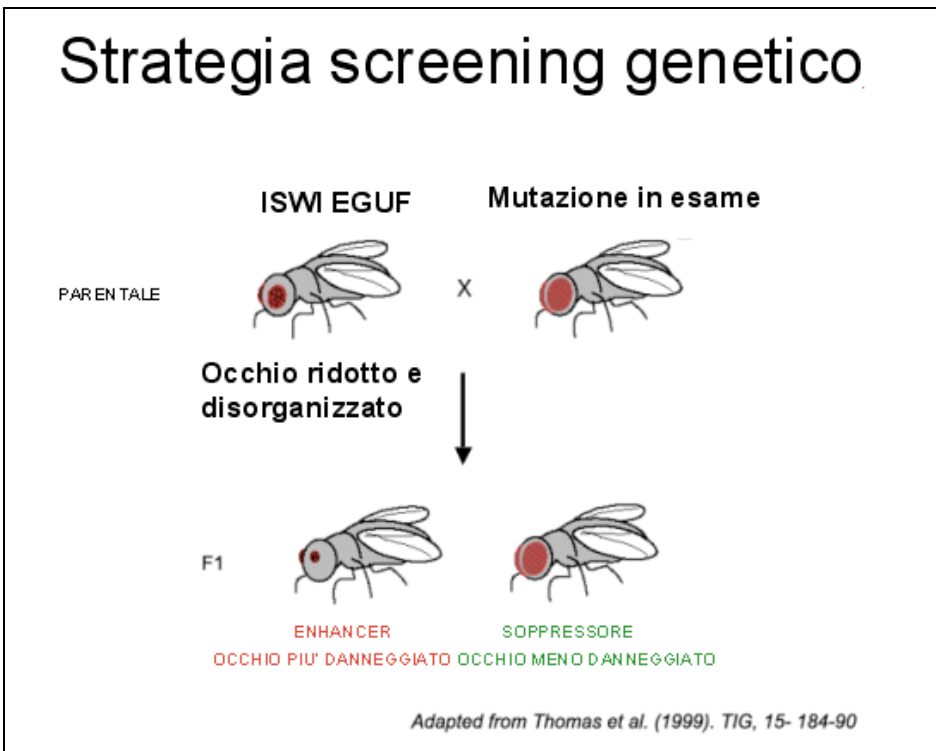


Figura 8. Strategia dello screening genetico. Mosche ISWI-EGUF sono incrociate con mosche mutate. Se le mosche della progenie hanno un occhio più danneggiato del controllo la mutazione in esame è un enhancer. Viceversa, se le mosche della progenie hanno un occhio meno danneggiato del controllo la mutazione in esame è un soppressore.

Il fenotipo risultante dalla perdita di ISWI nell'occhio tramite l'approccio EGUF è stato da me utilizzato come saggio *in vivo* per identificare, in uno screening genetico, fattori che peggiorino (enhancer) o migliorino (soppressori) tale fenotipo (Figura 8), utilizzando tre diversi tipi di mutazioni.

1)MODIFICATORI DOMINANTI PER DELEZIONI GENOMICHE:

Ho scelto di utilizzare una collezione di linee isogeniche di *Drosophila melanogaster* portanti delezioni sul terzo e sul quarto cromosoma (Ryder E, et al., 2007) Le delezioni coprono quasi interamente il genoma del terzo e del quarto cromosoma. L'uso di mutanti per delezione mi ha permesso di analizzare effetti dominanti della perdita in emizigosi di larghe parti del genoma. In tal modo, ho potuto in breve tempo analizzare una grande parte del genoma di *Drosophila melanogaster*. Ho analizzato 100 delezioni ed ho isolato 3 delezioni con effetto enhancer e 4 con effetto soppressore (Figura 9 e Tabella 1).

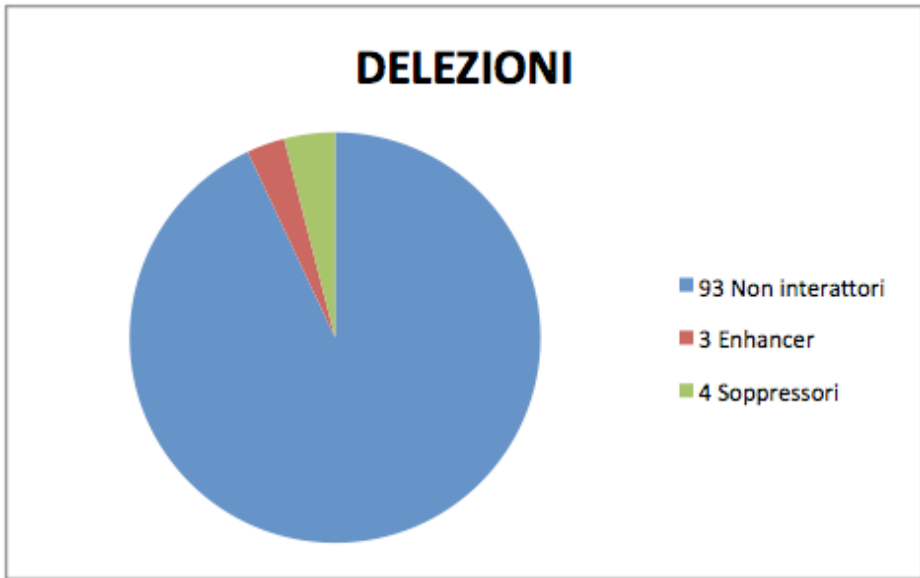


Figura 9. Delezioni genomiche isogeniche interagiscono con ISWI. L'uso di una collezione di delezioni ha permesso l'isolamento sia di enhancers che di soppressori del fenotipo ISWI-EGUF.

2)MODIFICATORI DOMINANTI E RECESSIVI PER PERDITA DI FUNZIONE

Ho creato mutanti di inserzione tramite la mobilitazione di un trasposone Piggy-Bac (Hacker U, et al, 2003). I mutanti sono generati inducendo la trasposizione di un trasposone Piggy-Bac all'interno di mosche ISWI-EGUF che in modo casuale è in grado di inserirsi all'interno del genoma compromettendo in ogni singolo mutante la

funzione di un singolo gene. Il vantaggio dell'approccio che ho utilizzato consiste nell'utilizzo di diversi marcatori fluorescenti presenti nel cromosoma che fornisce la fonte di trasposasi ed in quello che possiede l'elemento trasponibile Piggy-Bac (Hacker U, et al, 2003). L'uso di marcatori fluorescenti mi ha permesso di seguire i cromosomi che possedevano la trasposasi e l'elemento trasponibile, senza dovere utilizzare cromosomi bilanciatori. Difatti l'uso di marcatori fluorescenti mi ha permesso di risalire agevolmente dai fenotipi ai genotipi, semplificando notevolmente la strategia dello screening. (Figura 10).

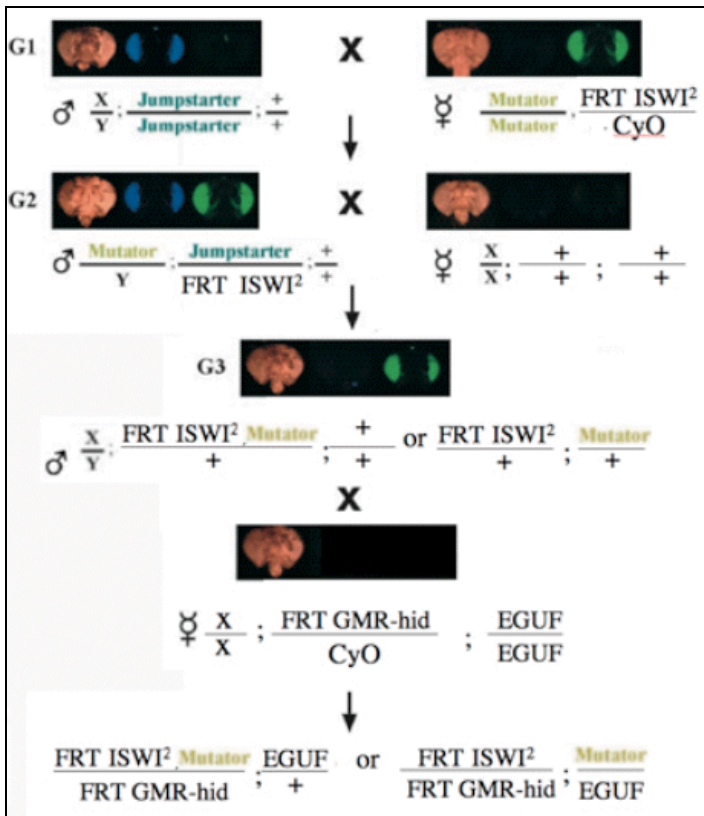


Figura 10. Strategia dello screening genetico attraverso l'uso del trasposone Piggy-Bac. Adattato da Hacker, U. et al., (2003). Utilizzando la trasposizione del trasposone Piggy-bac sono state mutagenizzate mosche portanti l'allele ISWI² (G1). L'uso di marcatori fluorescenti ha permesso di isolare agevolmente le mosche in cui era avvenuta la trasposizione (G2). Solo le mosche in cui è avvenuta la trasposizione sono state testate utilizzando l'approccio EGUF con il fine di isolare enhancer o soppressori del fenotipo di controllo ISWI-EGUF (G3).

L'uso della trasposizione del trasposone Piggy-Bac è un esperimento di genetica diretta volto a creare nuove mutazioni differenti da quelle di linee di mosce già presenti in collezioni annotate in banca dati (www.flybase.org). Un altro vantaggio di questo approccio è che le mutazioni provocate dalla trasposizione del trasposone Piggy-Bac sul braccio 2R ricombinano insieme all'allele *ISWI*². In tal modo nelle cellule che formeranno l'occhio adulto ISWI-EGUF le mutazioni sul braccio 2R saranno in omozigosi. Ho potuto in tal modo analizzare se mutazioni recessive sul braccio 2R interagissero nello screening. Una volta confermata l'interazione, la presenza del trasposone Piggy-Bac nel sito di inserzione mi ha permesso di risalire agevolmente al gene la cui funzione sia stata interrotta tramite la tecnica di iPCR (Kolmodin LA, Williams JF, 1997). Ho analizzato circa 1700 singoli nuovi mutanti ed ho isolato 3 soppressori e 18 enhancers (Figura 11 e Tabella 1).

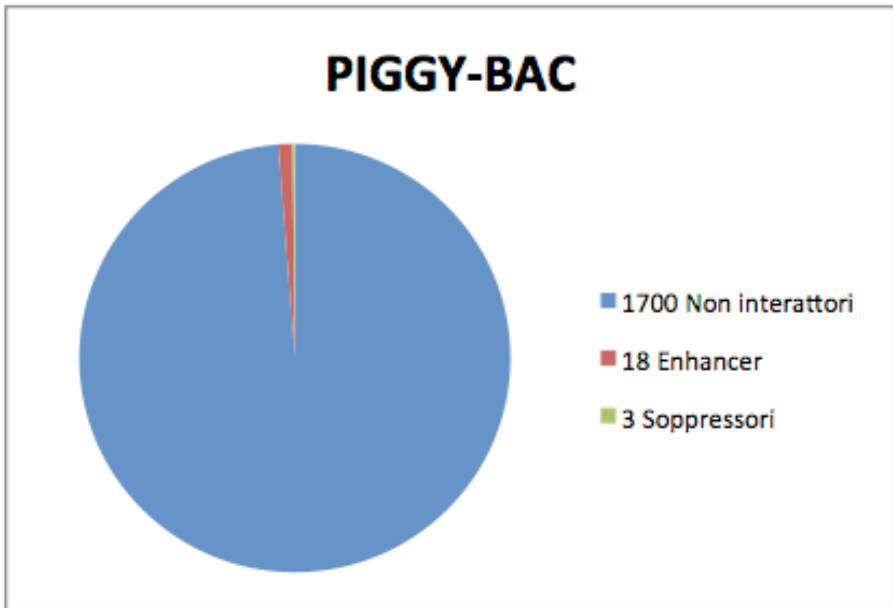


Figura 11. Mutanti Piggy-Bac interagenti. Mutazioni inserzionali generate utilizzando il trasposone Piggy-Bac hanno interagito come enhancers e soppressori del fenotipo ISWI-EGUF.

3) **MODIFICATORI DOMINANTI PER PERDITA O GUADAGNO DI FUNZIONE:** ho analizzato una vasta collezione di linee di mosche dette linee EP (Rorth P, 1996) generate dalla trasposizione di un elemento P all'interno del genoma di *Drosophila melanogaster*. I siti di

inserzione del trasposone sono mappati e presenti nella banca dati Flybase (www.flybase.org). Il trasposone P utilizzato per creare questa collezione di linee possiede al suo interno un enhancer inducibile. In base al punto di inserzione ed all'orientamento del trasposone, questi può indurre o ridurre l'espressione del gene in cui è inserito. Questo metodo mi ha permesso di isolare mutanti sia per perdita che per guadagno di funzione. Ho analizzato circa 900 mutanti ed ho isolato 32 soppressori, 50 enhancers, ed 8 mutanti che ho nominato bimodali (Figura 12 e Tabella 1). In questi mutanti bimodali all'interno della classe sperimentale della stessa progenie una parte delle mosche hanno presentato occhi che potevano essere considerati di un fenotipo enhancer ed una parte che potevano essere considerati di un fenotipo soppressore.

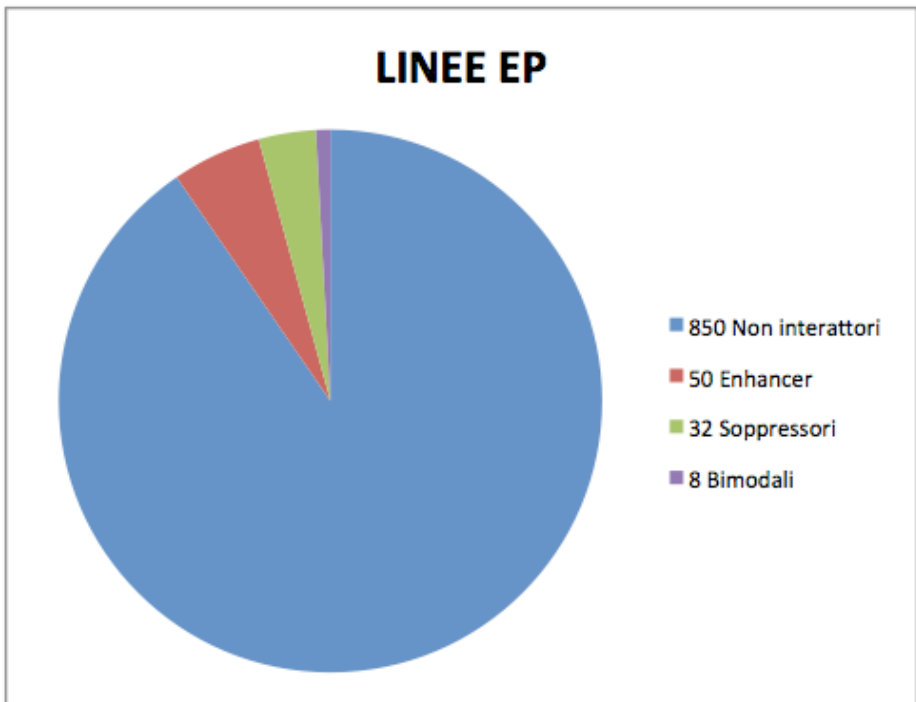


Figura 12. Mutanti EP interagenti. L'uso di una collezione di linee EP ha permesso l'isolamento sia di enhancers che di soppressori del fenotipo ISWI-EGUF. Una piccola classe di mutazioni ha dato progenie i cui occhi avevano caratteristiche in parte di soppressori ed in parte di enhancers (bimodali).

INTERATTORI ISOLATI:

La strategia utilizzata per condurre lo screening ha permesso per ognuno dei tre approcci di isolare sia soppressori che enhancers del fenotipo della classe controllo ISWI-EGUF (Figura 13 e Tabella 1).

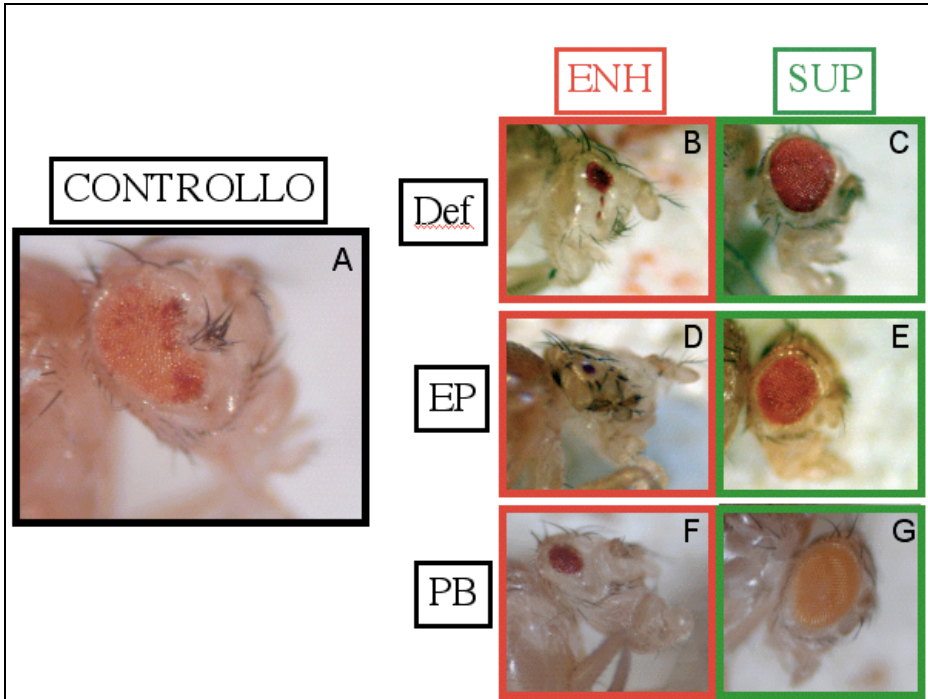


Figura 13. Isolamento di enhancers e soppressori di ISWI-EGUF. (A) classe controllo ISWI-EGUF. **Esempi di interazione per (B)** delezione enhancer, (C) delezione soppressore, (D) EP enhancer, (E) EP soppressore, (F) PBac enhancer., (G) PBac soppressore.

INTERATTORE	INTERAZIONE	MUTAZIONE	ISWI K159R	FUNZIONE
<i>aralar1</i>	ENHANCER	EP		Trasporto lipidico mitocondriale calcio dipendente.
<i>As</i>	ENHANCER	EP		Ubiquitina ligasi alla base della sindrome di Angelman.
<i>Atx2</i>	ENHANCER	EP	SI'	Ataxin 2, legame all'mRNA.
<i>blot</i>	ENHANCER	EP		Sintesi di ATP e trasporto di neurotrasmettitori.
<i>CG 17180</i>	ENHANCER	EP		Sconosciuta.

CG10426	ENHANCER	EP	SI'	Fosfatasi dell'inositolo trifosfato.
CG11033	SOPPRESS ORE	EP	SI'	TF a dita di zinco.
CG11652	ENHANCER	PBac		Sconosciuta.
CG11844	ENHANCER	PBac		Sconosciuta.
CG12862	ENHANCER	PBac		Sconosciuta.
CG13623	SOPPRESS ORE	EP		Sconosciuta.
CG13895	ENHANCER	EP	SI'	Proteina legante il DNA coinvolta nella trascrizione.
CG14508	ENHANCER	PBac		Trasportatore di elettroni del complesso CoQH2-citocromo c.
CG15128	SOPPRESS ORE	PBac		Sconosciuta.
CG15425	ENHANCER	PBac		Sconosciuta.
CG17593	ENHANCER	PBac		Sconosciuta.
CG17732	ENHANCER	PBac		Sconosciuta.
CG18869	SOPPRESS ORE	EP	SI'	Trasferasi di zuccheri coinvolta nei processi di difesa.
CG3092	ENHANCER	PBac		Sconosciuta.
CG31044	SOPPRESS ORE	EP		Sconosciuta.
CG31475	SOPPRESS ORE	EP		Trasduzione del segnale mediata dal calcio.
CG33523	ENHANCER	EP		Proteina strutturale.
CG4294	ENHANCER	PBac		Pirofosfatasi.
CG5180	SOPPRESS ORE	EP	SI'	Sconosciuta.
CG5208	ENHANCER	EP	SI'	Sconosciuta.
CG5555	SOPPRESS ORE	EP	SI'	TF a dita di zinco.
CG5629	SOPPRESS ORE	EP	SI'	Sconosciuta.
CG5789	ENHANCER	EP		Attività ATPasica legata al trasporto di xenobiotici.
CG5807	SOPPRESS ORE	EP		Sconosciuta.
CG6650	SOPPRESS ORE	EP		Sconosciuta.
CG7420	ENHANCER	PBac		Fattore di scambio delle piccole proteine G.
CG7430	SOPPRESS ORE	EP		Proteina FAD legante coinvolta nel ciclo degli acidi tricarbossilici.
CG7560	SOPPRESS ORE	EP	SI'	NADPH reduttasi.
CG8219	SOPPRESS ORE	EP		Importina nucleare.

<i>CG8420</i>	ENHANCER	EP		Sconosciuta.
<i>CG9287</i>	ENHANCER	PBac		Attività carbossilesterasica.
<i>CG9746</i>	ENHANCER	EP		Attività SR chinasi coinvolta nel trasporto lisosomiale.
<i>Chd64</i>	ENHANCER	EP		Legame all'actina.
<i>chn</i>	ENHANCER	PBac		TF coinvolto nella morfogenesi.
<i>cpo</i>	BIMODALE	EP	SI'	Proteina che lega l'mRNA coinvolta nello sviluppo del NS.
<i>Crc</i>	ENHANCER	EP		Calreticulina.
<i>Df(3L)ED 4799</i>	ENHANCER	Def		3L 76A1-76B3
<i>Df(3R)ED 10809</i>	ENHANCER	Def		3R 92F1-93B8
<i>Df(3R)ED 5177</i>	SOPPRESS ORE	Def		3R 83B4-83B6
<i>Df(3R)ED 5230</i>	SOPPRESS ORE	Def		3R 84E6-85A5
<i>Df(3R)ED 5429</i>	ENHANCER	Def		3R 85D1-85F8
<i>Df(3R)ED 5623</i>	SOPPRESS ORE	Def		3R 87E3-88A4
<i>Df(4)ED6 384</i>	SOPPRESS ORE	Def		4 102B6-102C5
<i>DNApolδ</i>	ENHANCER	EP		Dna polimerasi delta.
<i>Doa</i>	BIMODALE	EP		SR chinasi della cascata delle MAP chinasi.
<i>dsd</i>	BIMODALE	EP		Recettore coinvolto nell'adesione cellulare.
<i>E(Pc) inv</i>	SOPPRESS ORE	PBac		Sconosciuta.
<i>E2f</i>	ENHANCER	PBac		TF coinvolto nella regolazione del ciclo cellulare.
<i>eff</i>	SOPPRESS ORE	EP		Ubiquitina ligasi coinvolta nella regolazione della mitosi e della meiosi.
<i>Eip75B</i>	ENHANCER	EP	SI'	Proteina indotta dall'eccidione 75B, TF.
<i>Eip78C</i>	ENHANCER	EP	SI'	Proteina 78C indotta dall'eccidione, TF.
<i>emc</i>	ENHANCER	EP		extramacrochaetae,
<i>eRF1</i>	SOPPRESS ORE	EP	SI'	Fattore di terminazione coinvolte in morte autofagica.
<i>ergic53</i>	ENHANCER	EP		Proteina legante il mannosio.
<i>exba</i>	ENHANCER	EP		fattore di inizio della traduzione coinvolto nella memoria a lungo termine.
<i>fax</i>	SOPPRESS ORE	EP	SI'	Trasmissione dell'impulso nervoso.
<i>Fer2LCH</i>	ENHANCER	EP	SI'	Omologo della catena leggera 2 della ferritina.
<i>Gap1</i>	ENHANCER	PBac		Gap della proteina ras coinvolta nella cascata delle MAP chinasi.

<i>Gclm</i>	ENHANCER	EP		Ligasi glutammato-cisteina; biosintesi del glutatione.
<i>GlcAT-P</i>	ENHANCER	EP		Attività glucuronosiltransferasica.
<i>HLHm7</i>	SOPPRESS ORE	EP		TF specifico della RNAPolII coinvolto nella proliferazione cellulare.
<i>Hsp27</i>	SOPPRESS ORE	EP	SI'	Proteina da shock termico 27.
<i>HSRω</i>	BIMODALE	EP		Rna da shock termico Omega.
<i>Jheh2</i>	ENHANCER	EP		Sconosciuta.
<i>lark</i>	SOPPRESS ORE	EP		Proteina che lega l'mRNA coinvolta nei processi ritmici.
<i>Lk6</i>	SOPPRESS ORE	EP		SR chinasi coinvolta nella trasduzione del segnale.
<i>LysB</i>	BIMODALE	EP		Lisozima B.
<i>Madm</i>	ENHANCER	EP		Attività SR chinasi coinvolta nella trasduzione del segnale.
<i>mbc</i>	SOPPRESS ORE	EP		Fattore di scambio per piccole proteine G.
<i>mbf1</i>	SOPPRESS ORE	EP	SI'	Proteina legante CpG metilate, regolazione della trascrizione.
<i>Mdh</i>	SOPPRESS ORE	EP		Malato deidrogenasi.
<i>mir-279</i>	SOPPRESS ORE	EP		Sconosciuta.
<i>MKP3</i>	ENHANCER	EP		Fosfatasi delle MAP chinasi.
<i>MMS19</i>	ENHANCER	EP		Riparazione del DNA.
<i>mor</i>	ENHANCER	EP		Subunità del complesso BRM.
<i>mura</i>	ENHANCER	EP	SI'	Legame di proteine, memoria ed apprendimento.
<i>NinaE</i>	ENHANCER	EP		Attività recettoriale accoppiata a proteine G.
<i>Nrx-IV</i>	ENHANCER	EP		Recettore transmembrana; fosfatidilinositolo 3-chinasi.
<i>olf413</i>	ENHANCER	EP		Attività beta-monoossigenasi della dopamina.
<i>osa</i>	ENHANCER	EP	SI'	Subunità del complesso BRM.
<i>Pen</i>	ENHANCER	PBac		Importina nucleare.
<i>PK61C</i>	ENHANCER	PBac		Protein chinasi 61C
<i>poly</i>	ENHANCER	EP		Sconosciuta.
<i>pum</i>	ENHANCER	EP	SI'	Legame mRNA 3' UTR.
<i>RhoGAP6 8F</i>	ENHANCER	EP		Fattore di attivazione di Rho GTPasi.
<i>RhoL</i>	BIMODALE	EP		rho-like GTPasi coinvolta nell'adesione cellulare.
<i>RpL40</i>	ENHANCER	PBac		Proteina ribosomiale.
<i>Rpn9</i>	ENHANCER	EP		Proteolisi, regolazione dell'uscita dalla

				mitosi.
<i>slif</i>	ENHANCER	PBac		Trasportatore di aminoacidi.
<i>slmb</i>	SOPPRESSORE	EP		Ubiquitina ligasi coinvolta nel differenziamento e nella regolazione del ciclo cellulare.
<i>SNF4Aγ</i>	BIMODALE	EP	SI'	SRchinasi coinvolta nella trasduzione del segnale.
<i>Spec2</i>	ENHANCER	EP		Sconosciuta.
<i>sqd</i>	SOPPRESSORE	EP		Proteina legante l'mRNA 3'-UTR coinvolta nella polarità cellulare.
<i>Ssdp</i>	ENHANCER	EP		Proteina che lega sequenze specifiche di DNA a singolo filamento.
<i>stg</i>	ENHANCER	PBac		YSR fosfatasi coinvolta nella transizione G2/M.
<i>tankyrase</i>	ENHANCER	EP		PARP telomerica.
<i>Tektin-C</i>	ENHANCER	EP		Costituente strutturale dei microtubuli.
<i>Tfb2</i>	SOPPRESSORE	EP		Fattore di trascrizione generico della RNAPolII.
<i>trx</i>	SOPPRESSORE	EP	SI'	H3-K4 metiltrasferasi, rimodellatore covalente della cromatina.
<i>Tsp96F</i>	ENHANCER	EP		Adesione cellula-cellula e trasduzione del segnale.
<i>ttk</i>	SOPPRESSORE	EP	SI'	Repressore della RNAPolII coinvolta nella determinazione del destino cellulare.
<i>Vha13</i>	SOPPRESSORE	EP		Trasporto protonico vacuolare.
<i>wdb</i>	SOPPRESSORE	EP		SR fosfatasi coinvolta nella trasduzione del segnale.
<i>wun</i>	SOPPRESSORE	PBac		Fosfatasi dell'acido fosfatidico coinvolto nei processi apoptotici.

Tabella1. ISWI interagisce con diversi fattori cellulari. Nella prima colonna riporto in ordine alfabetico il nome del gene mutato o la line di mosca contenente la delezione presa in esame. Nella seconda colonna se interagisce come enhancer o come soppressore del fenotipo. Nella terza colonna la natura della mutazione (EP se è stata isolata attraverso una linea EP, PBac se è un mutante PBac, Def se è una linea della collezione di delezioni). Nella quarta colonna se è o meno uno degli interattori isolati nello screening che utilizzava come saggio il fenotipo dell'occhio indotto dalla mispressione di ISWI^{K159R}. Nella quinta colonna indico brevemente la funzione del gene isolato, se nota.

ANALISI BIOINFORMATICA DEGLI INTERATTORI:

Ho voluto analizzare se gli interattori da me isolati facessero parte di network di interazioni già noti in letteratura. Per le linee EP ho considerato come geni interagenti quelli su cui cadono le inserzioni P secondo l'annotazione della banca dati www.flybase.org. Per le inserzioni Piggy-Bac ho considerato come geni interagenti quelli su cui cadono le inserzioni Piggy-Bac secondo i risultati di iPCR. Ho preso quindi in esame i geni interagenti isolati tramite lo screening e li ho analizzati tramite il software Osprey (<http://biodata.mshri.on.ca/osprey/servlet/index>). Questo programma permette di analizzare la banca dati Biogrid (www.thebiogrid.org) per cercare network di interazioni già noti in letteratura. Riporto in figura 14 i risultati dell'analisi; nella figura, ogni nodo rappresenta un interattore isolato, ogni linea una interazione nota in Biogrid.

(HMG) *ttk* (Murawsky CM, et al., 2001) che interagisce con un gene che codifica per una ubiquitina-ligasi (*eff*) (Ryoo HD, et al., 2002; Cenci G, et al., 1997) ed una fosfatasi coinvolta nella regolazione del ciclo cellulare (*stg*) (Quinn LM, et al., 2003). Un altro network isolato è quello composto dai geni *HSR ω* e *sqd*, i cui prodotti genici sono componenti strutturali delle hnRNP (heterogenous nuclear RNA binding proteins) (Arya R., et al., 2007). La presenza di geni correlati funzionalmente all'interno dei geni isolati attraverso lo screening suggerisce fortemente che lo screening sia riuscito ad evidenziare network funzionali che interagiscono con l'attività di ISWI.

Il software *osprey* permette inoltre di analizzare gli interattori isolati classificandoli in base alla loro funzione cellulare secondo ontologia genica (Grossmann S, et al., 2007; Ashburner M, et al., 2000) (Figura 15). L'analisi bioinformatica ha permesso di classificare i geni in base alla loro compartimentalizzazione cellulare ed i pathway biochimici in cui i loro prodotti genici sono coinvolti. Sono stati isolati interattori appartenenti a tutte le categorie di ontologia genica, senza evidenziare una categoria che interagisca in modo preferenziale.

siano riusciti ad isolare effettivi interattori di ISWI, ma la natura differente dei saggi utilizzati ha permesso probabilmente di evidenziare differenti subpopolazioni di interattori solo parzialmente sovrapponibili (Figura 16, vedi inoltre la tabella 1).

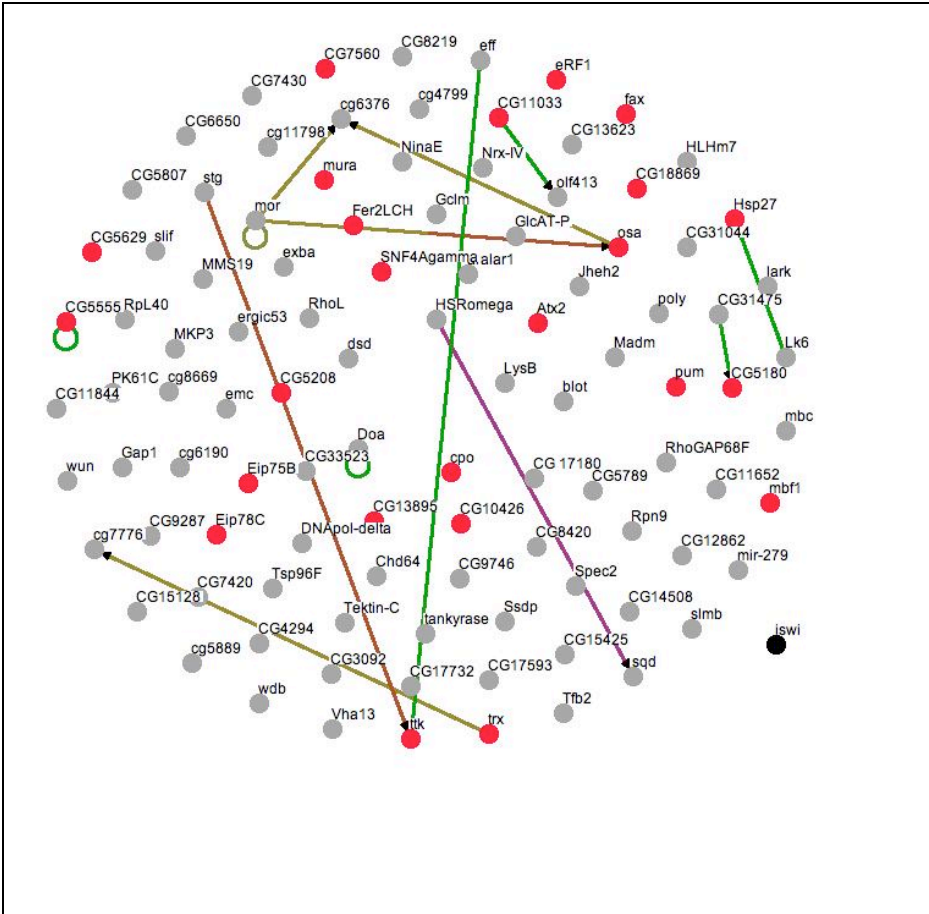


Figura 16. Lo screening ISWI-EGUF ha identificato alcuni interattori in comune con lo screening ISWI^{KI59R}. Ogni nodo rappresenta un interattore isolato attraverso lo screening ISWI-EGUF, ogni linea una interazione nota in Biogrid. In basso a destra ISWI, in nero. In rosso gli interattori isolati in entrambi gli screening. In grigio gli interattori isolati solo nello screening ISWI-EGUF.

La maggioranza degli interattori comuni sono geni il cui prodotto è nucleare e che svolgono la loro funzione attraverso il legame alla cromatina (10 su 24). Altre classi presenti in modo significativo sono geni che codificano per proteine del metabolismo dell'RNA(3 su 10),

del mantenimento del potenziale energetico ed ossidoriduttivo delle cellula(2 su 10) e della trasduzione del segnale(2 su 10).

Da notare che non tutti gli interattori isolati in comune tra i due screening si comportano in entrambi i casi da enhancer. Sebbene nello screening ISWI^{K159R} si sia stati in grado di isolare solo mutazioni che interagivano peggiorando il fenotipo, sui 24 geni isolati in comune tra i due screening solo 10 si comportano da enhancer nello screening ISWI-EGUF, mentre 12 si comportano da soppressori e 2 hanno un comportamento bimodale. Il significato biologico di queste differenze è dubbio, ma probabilmente riflette i differenti metodi utilizzati nei due screening per ridurre le funzioni di ISWI nei territori dell'occhio.

VALIDAZIONE DI ALCUNE INTERAZIONI IDENTIFICATE NELLO SCREENING:

Al fine di validare l'identità di alcuni degli interattori da me isolati, ho testato una serie di alleli corrispondenti ai geni interagenti e che risultavano disponibili su Flybase (www.flybase.org; Tabella 2).

Ho selezionato per questa analisi il gene *cpo* (Bellen HJ, et al., 1992) in quanto isolato sia sia nello screening ISWI^{K159R} che nello screening ISWI-EGUF. In entrambi gli screening hanno interagito più alleli dello stesso gene. Inoltre *cpo* è uno dei geni che ha interagito in modo bimodale all'interno dello screening ISWI-EGUF. Ho analizzato altri quattro alleli, di cui tre hanno interagito come enhancer ed uno in modo bimodale (Tabella 2). Poiché tutti gli alleli del gene *cpo* che ho testato hanno interagito, vi sono forti indicazioni che il prodotto del gene *cpo* possa interagire coi i pathway in cui ISWI sia coinvolta.

Ho selezionato inoltre per questa analisi i geni *effete* (Ryoo HD, et al., 2002; Cenci G, et al., 1997), *tramtrack* (Murawsky CM, et al., 2001) e *string* (Quinn LM, et al., 2003), in quanto presenti in un network isolato tramite l'analisi bioinformatica. *tramtrack* è un gene il cui prodotto è una high mobility group protein (HMG) isolato sia nello screening ISWI^{K159R} che nello screening ISWI-EGUF. Nello screening ISWI-EGUF *tramtrack* si è comportato da soppressore. *effete* è stato isolato come un soppressore ed è coinvolto nel metabolismo dei telomeri. Il prodotto del gene *string* è coinvolto nella regolazione del ciclo cellulare. Ho testato per *tramtrack* tre alleli, di cui uno si è comportato da soppressore e due da enhancer. Per *effete* e *string* ho testato due alleli ciascuno. Per ognuno dei due geni uno si è comportato da enhancer ed uno in modo bimodale (Tabella 2). Poiché tutti gli alleli dei geni *effete*, *tramtrack* e *string* che ho testato hanno interagito, vi sono forti indicazioni che ISWI possa essere coinvolta nel network di cui geni *effete*, *tramtrack* e *string* sono coinvolti.

Un altro gruppo di geni che è stato identificato tramite l'analisi informatica contiene i geni *HSR ω* e *squid* (Arya R, et al., 2007). I prodotti di quest geni fanno parte delle hnRNP (heterogenous nuclear RNA binding proteins) (Arya R, et al., 2007). *HSR ω* ha interagito in modo bimodale, ed il suo prodotto genico finale sono diversi RNA non codificanti inducibili e spaziotemporalmente regolati nella loro

espressione. Ho testato per *HSR ω* un allele che ha interagito come enhancer, mentre per *squid* ho testato tre alleli di cui due hanno interagito da enhancer ed uno da soppressore (Tabella 2). Poiché tutti gli alleli dei geni *HSR ω* e *squid* che ho testato hanno interagito, vi sono forti indicazioni che le funzioni di ISWI regolino o siano regolate dalle hnRNP, di cui i prodotti dei geni *HSR ω* e *squid* sono componenti strutturali.

Infine ho scelto come gene candidato a questa analisi il gene *mbf1* (Takemaru K, et al., 1997). Il suo prodotto genico è una proteina che lega le isole CpG metilate. È probabile che i rimodellatori della cromatina ATP-dipendenti regolino le proprie funzioni in base alle modifiche covalenti della cromatina. Ho scelto di analizzare questo gene poiché codifica per una proteina che riconosce in modo specifico modifiche covalenti del DNA. Inoltre *mbf1* è uno dei geni isolato sia nello screening ISWI^{K159R} sia nello screening ISWI-EGUF. Nello screening ISWI-EGUF si è comportato da soppressore. Ho testato due alleli di *mbf1*, di questi uno si è comportato da enhancer ed uno da soppressore (Tabella 2). Poiché tutti gli alleli del gene *mbf1* che ho testato hanno interagito, vi sono forti indicazioni che lo stato di metilazione delle isole CpG possa avere delle interazioni funzionali con ISWI.

Per la maggior parte delle linee EP che interagiscono con ISWI, non è noto se queste determinano guadagno o perdita di funzione del gene in cui sono inserite. Per cui non deve meravigliare se esistono differenze tra il tipo di interazione esistente tra geni colpiti da linee EP ed altri alleli dello stesso gene.

GENE	ALLELE	INTERAZIONE
<i>cpo</i>	d00497	ENHANCER
<i>cpo</i>	d03424	BIMODALE
<i>cpo</i>	f02000	ENHANCER
<i>cpo</i>	f05989	ENHANCER
<i>eff</i>	d00904	ENHANCER
<i>eff</i>	e01950	BIMODALE
<i>HSR_ω</i>	e01850	ENHANCER
<i>mbf1</i>	f07605	ENHANCER
<i>mbf1</i>	fo5959	SOPPRESSORE
<i>sqd</i>	c04803	ENHANCER
<i>sqd</i>	e01416	SOPPRESSORE
<i>sqd</i>	f01931	ENHANCER
<i>stg</i>	d04407	BIMODALE
<i>stg</i>	c05571	ENHANCER
<i>ttk</i>	d02388	SOPPRESSORE
<i>ttk</i>	f00319	ENHANCER
<i>ttk</i>	c00547	ENHANCER

Tabella 2. Validazioni di alcune interazioni isolate nello screening ISWI-EGUF. Tutti gli alleli testati hanno interagito, confermando le interazioni isolate nello screening ISWI-EGUF, sebbene il tipo di interazione vari a secondo dell'allele preso in esame.

DICUSSIONE

ISWI INTERAGISCE CON ENHANCERS, SOPPRESSORI ED INTERATTORI BIMODALI

Lo screening genetico mi ha permesso di isolare degli interattori per il rimodellatore della cromatina ATP-dipendente ISWI. Gli interattori isolati hanno permesso di aumentare la comprensione del network funzionale di ISWI stesso. In base al metodo usato nello screening, considero che un enhancer genetico sia una mutazione per perdita di funzione di un fattore che lavora in agonismo con ISWI o per guadagno di funzione di un fattore che lavora in antagonismo con ISWI. Un soppressore genetico sarà invece una mutazione per perdita di funzione di un fattore che lavora in antagonismo con ISWI o per guadagno di funzione di un fattore che lavora in agonismo con ISWI. Una classe a parte di interattori sono quelli che agiscono in modo bimodale. Sebbene rappresentino una piccola parte degli interattori isolati il loro isolamento pone interessanti quesiti. Per comprendere il significato biologico della loro interazione bisognerà caratterizzare dal punto di vista molecolare l'interazione isolata geneticamente con ISWI. In un'ipotesi plausibile, ISWI reprime le funzioni degli interattori bimodali mentre questi sono attivatori delle funzioni di ISWI, in un feedback di controllo. In alternativa gli interattori bimodali potrebbero essere attivati dalle funzioni di ISWI ed essere repressori delle funzioni di ISWI, in un feedback di controllo speculare al precedente. In entrambi i casi, se ciò fosse vero, una loro deregolazione potrebbe portare in modo stocastico ad una iper od ipo-attivazione delle funzioni di ISWI, che si rifletterebbe nell' interazione bimodale che ho osservato.

ISWI INTERAGISCE CON PICCOLI NETWORKS DI PROTEINE

L'analisi bioinformatica degli interattori ha messo in evidenza network già noti di interattori, come annotato nella banca dati Biogrid. Come è interessante notare, molti degli interattori presenti in questi network risultano essere, a vario titolo, protagonisti noti dei processi che regolano il ciclo cellulare, i processi apoptotici ed il differenziamento (Tabella 1).

Un network isolato è composto dai geni *E2f*, *moira* ed *osa* (Staebling-Hampton K, et al., 1999; Moshkin YM, et al, 2007).

La proteina E2F è un componente essenziale per la regolazione della progressione attraverso il ciclo cellulare. Come fattore di trascrizione regola positivamente molti fattori richiesti per iniziare la fase S del ciclo cellulare, la fase di replicazione del genoma (Duronio RJ, O'Farrell PH, 1995; Duronio RJ, et al., 1995). L'interazione di E2F con la Ciclina E è particolarmente complessa. La Ciclina E, che è la subunità regolativa del complesso chinasi Ciclina E/cdk2, regola l'ingresso in fase S fosforilando specifici substrati bersaglio. Ma l'espressione della Ciclina E durante la fase G1-S richiede a sua volta E2F. La funzione di E2F è a sua volta regolato dalla proteina pRb (Zhu L, et al., 1994; Zhu L, et al., 1995) Durante la fase G1 la forma ipofosforilata di pRB è in grado di sequestrare E2F, questo complesso è in grado di reprimere i bersagli trascrizionali di E2F stesso. L'iperfosforilazione regolata di pRB provoca il rilascio di E2F e la conseguente attivazione degli obiettivi trascrizionali di E2F stesso. Come è interessante notare, uno screening genetico per interattori per E2F ha permesso di isolare come interattori *Brama*, *osa* e *moira*, tre geni i cui prodotti sono proteine facenti parte del complesso di rimodellamento della cromatina ATP-dipendente BRM (Staebling-Hampton K, et al., 1999). Questi studi hanno mostrato che l'attività repressiva di pRB nei confronti di E2F è bloccata da mutazioni che impediscono il corretto funzionamento del complesso BRM (Moshkin Y. M, et al, 2007) L'isolamento di questo network pone interessanti quesiti. È avvincente ipotizzare uno scenario dove i complessi di rimodellamento repressivi (quali quelli contenenti ISWI) e quelli attivatori (quali quelli contenenti Brhama, moira ed osa) della trascrizione possano svolgere un'azione regolativa sul network

funzionale di E2F, che a sua volta regola la progressione del ciclo cellulare.

Un altro network isolato è composto dai geni *effete* (Ryoo HD, et al., 2002; Cenci G, et al., 1997), *tramtrack* (Murawsky CM, et al., 2001) e *string* (Quinn LM, et al., 2003).

Il prodotto del gene *tramtrack* è una HMG che funziona da repressore trascrizionale che riveste molti ruoli chiave all'interno della cellula, in quanto su di essa convergono diversi pathway alla base dei processi di differenziamento. È una proteina la cui espressione è temporaneamente regolata dai pathway di *Notch* e dell'*EGFR* (Guo M, et al., 1996) ed a sua volta regola, con funzioni repressive, il promotore di *fushi-tarazu*, uno dei geni omeotici chiave dello sviluppo e del differenziamento (Guo M, et al., 1996). L'emivita della proteina Tramtrack è a sua volta regolata dal pathway di Ras-MAPK, che ne promuove la degradazione (Niu H, et al., 1998). È interessante notare che Tramtrack ha un effetto repressivo sull'espressione di String (Jordan KC, et al., 2006) uno dei fattori isolati nel mio screening. String attiva la mitosi rimuovendo un evento di fosforilazione dalla proteina cdk2 (Reis T, Edgar BA, 2004) una chinasi ciclina dipendente che forma eterodimeri con la Ciclina A, con la Ciclina B e con la Ciclina E. In altre parole, String è una fosfatasi che agisce come un regolatore chiave dell'attività delle cicline/cdk2. Poiché regola l'attività del complesso cdk2/Ciclina E, String regola in modo indiretto l'attività di E2F, altro interattore isolato all'interno dello screening. È stato inoltre dimostrato che il complesso BRM è necessario per il corretto proseguimento del ciclo cellulare attraverso G2/M attraverso diretta regolazione trascrizionale del gene *string* (Quinn LM, et al., 2003; Zrali CB, et al., 2004). Questi dati suggeriscono strette relazioni funzionali tra il network E2F-moira-osa ed il network *tramtrack-effete-string*.

Altro gene di questo network è il gene *effete*. È stato isolato in precedenza come interattore genetico di *tramtrack*, ma la natura della sua interazione funzionale con il pathway *tramtrack-string* non è stata ancora caratterizzata dal punto di vista molecolare. Effete è un'ubiquitina ligasi E2 che sembra coinvolta nei processi di meiosi maschili e nella mitosi (Ryoo HD, et al., 2002). È stato evidenziato che in preparazioni cariotipiche di cellule in metafase di mutanti nulli di *effete* si possono riscontrare frequenti fusioni telomeriche, suggerendo un ruolo di Effete nel mantenimento della stabilità telomerica (Cenci G, et al., 1997). Sembra possibile che Effete svolga un ruolo anche nel

differenziamento, in quanto l'omologo di effete in lievito, UBCD4, sembra coinvolto nello switch del mating type, che è lo stesso pathway in cui è coinvolto l'omologo in lievito del complesso BRM (SWI/SNF, da cui l'acronimo stesso) (Ryoo HD, et al., 2002). Infine sembra possibile un coinvolgimento diretto di Effete sulla regolazione del ciclo cellulare e del differenziamento, in quanto vi sono evidenze sperimentali che suggeriscono che Effete possa essere l'ubiquitina ligasi responsabile dell'ubiquitinazione di p53 (Ryoo HD, et al., 2002), il così detto guardiano del genoma, proteina principe della regolazione della riparazione dei danni al DNA, della progressione attraverso il ciclo cellulare e della morte per apoptosi.

L'interazione di ISWI con questo network pone l'ipotesi che ISWI possa adiuvarne l'attività della HMG Tramtrack nello svolgimento delle sue funzioni repressive, essendo entrambe repressori trascrizionali. Se ciò fosse vero, la mancanza di ISWI renderebbe meno efficiente la repressione delle funzioni di String, direttamente od indirettamente, evento che a sua volta potrebbe portare ad una aumentata progressione attraverso il ciclo cellulare, attraverso l'iperattivazione delle chinasi ciclina-dipendenti. Questo evento a sua volta potrebbe essere coinvolto nella trasformazione neoplastica. Inoltre, visto il ruolo di *effete* sulla stabilità dei telomeri, sembra possibile un coinvolgimento di ISWI nel rimodellamento della cromatina dei telomeri. Una aumentata instabilità telomerica aumenta la possibilità di danno al telomero, evento che porta a morte per apoptosi o, nell'eventualità che si sfugga a questo evento, ad una elevata instabilità genomica, spesso associata alla trasformazione neoplastica (Seimiya H, 2006).

Un terzo network isolato è composto dai geni *heat shock response ω* e *squid* (Arya, R., et al., 2007).

Il gene *heat shock response ω* è attivo nella quasi totalità di tipi cellulari ed è uno dei geni più fortemente indotti in seguito a shock termico. Questo gene produce diversi tipi di RNA non codificanti come prodotto funzionale finale. Il trascritto di questo gene superiore a 10 chilobasi di lunghezza è localizzato esclusivamente nel nucleo, ed è dinamicamente associato con differenti hnRNP (heterogenous nuclear RNA binding proteins) a formare le così dette "*omega spekles*" nucleoplasmatiche (Arya, R., et al., 2007). Squid è un componente costitutivo delle hnRNP. È stato suggerito che le *omega spekles* regolino il traffico nucleare e la disponibilità delle hnRNP ed altre

proteine che legano gli RNA per gestirne il traffico e localizzazione. È stato dimostrato che la deplezione di RNA prodotti dal locus *heat shock response* ω così come degli hnRNP bloccano l'induzione dell'apoptosi (Arya, R., et al., 2007). È stato inoltre dimostrato che gli RNA prodotti dal locus *heat shock response* ω legano e modulano la funzione di HSP90, che a sua volta promuove l'inibizione dell'apoptosi mediata da NF-kB (Arya, R., et al., 2007). È stato inoltre dimostrato che una deplezione degli RNA prodotti dal locus *heat shock response* ω prevengano l'attivazione del pathway delle JNK, e questo evento potrebbe a sua volta inibire i processi apoptotici (Arya, R., et al., 2007). È interessante notare che Squid gestisce l'esportazione nucleare del messaggero per Gurken, principale ligando dell'EGFR che svolge le sue funzioni cellulari attraverso il pathway di *Ras*, preferenzialmente attivando pathway del differenziamento (Norvell A, et al., 1999). Ancora, Squid gestisce la localizzazione cellulare del messaggero prodotto da *fushi-tarazu*, il cui promotore, come abbiamo visto in precedenza, è regolato negativamente dalla proteina repressiva Tramtrack (Guo M, et al., 1996).

È interessante notare che le reti di interattori isolate attraverso l'analisi bioinformatica, se soggette ad un'analisi più approfondita, si integrino tra loro a formare delle reti di interazione ancora più complesse (dati non mostrati). L'interazione di ISWI con geni coinvolti nel metabolismo e nella localizzazione di RNA e con geni il cui prodotto sono RNA non codificanti stessi, pone interessanti quesiti. Il trascrittoma è composto principalmente da RNA non codificanti con funzioni regolative (Filipowicz W., et al., 2008). Una delle funzioni principali degli RNA non codificanti è quello di regolare l'espressione genica, in una sorta di meccanismo di feedback regolativo. È stato infatti dimostrato che alterazioni nel profilo trascrizionale di RNA non codificanti sono marker specifici di diverse forme tumorali ed alterazioni del trascrittoma possono contribuire alla trasformazione neoplastica (Barbarotto E, et al., 2008).

ALTRI INTERATTORI COINVOLTI NELLA REGOLAZIONE DEL CICLO CELLULARE:

La maggiorparte degli interattori isolati nel mio screening non fanno parte di network noti secondo la banca dati Biogrid. Cionondimeno, molti tra loro sono coinvolti a vario titolo nei processi di regolazione dell'apoptosi e della progressione del ciclo cellulare.

Un gene isolato attraverso il mio sceening è la *DNA polimerasi δ* (Venkatesan RN, et al., 2007). La DNA polimerasi δ eucariotica è un enzima essenziale, altamente conservato, che partecipa alla replicazione del DNA, alla riparazione del DNA, ed alla ricombinazione genetica. Si pensa che la DNA polimerasi δ sia coinvolta nella replicazione di una grande parte del genoma, sintetizzando principalmente il filamento ritardato, ma non solo. La DNA polimerasi δ è un enzima ad alta fedeltà, le cui mutazioni aumentano enormemente l'instabilità genomica e predispongono all'insorgenza del cancro. In uomo, mutazioni a carico della DNA polimerasi δ sono state trovate associate al cancro del colon (Venkatesan RN, et al., 2007). È possibile ipotizzare che una deregolazione dell'attività della DNA polimerasi δ possa predisporre all'insorgenza del cancro (Venkatesan RN, et al., 2007). È verosimile ipotizzare inoltre che una alterata struttura cromatinica causata dalla perdita di funzione di ISWI possa influenzare l'attività della DNA polimerasi δ. Se ciò fosse vero, un'alterata struttura cromatinica potrebbe aumentare gli errori introdotti durante la replicazione mediata dalla DNA polimerasi δ od ostacolare i processi di riparazione, evento che a sua volta potrebbe provocare instabilità genomica e predisporre all'insorgenza del cancro.

Un altro gene isolato attraverso lo screening è il gene *Hsp27* (Arya R, et al., 2007). La proteina Hsp27 appartiene alla famiglia delle piccole proteine da stress, costitutivamente abbondanti ed ubiquitarie. Hsp27 regola l'apoptosi attraverso la sua abilità di interagire con componenti chiave del pathway apoptotico, in particolare con quelli coinvolti nell'attivazione delle caspasi (Arya R, et al., 2007). Cambiamenti nell'equilibrio ossidoriduttivo intracellulare e la produzione di specie reattive dell'ossigeno possono iniziare la cascata apoptotica attraverso alterazioni del mitocondrio ed il rilascio di fattori proapoptotici (Arya R, et al., 2007). Hsp27 ha la capacità sia di mantenere un corretto

equilibrio ossidoriduttivo cellulare sia di stabilizzare il mitocondrio (Arya R, et al., 2007). Una aumentata espressione di Hsp27 durante la risposta allo stress è correlata ad una aumentata sopravvivenza (Arya R, et al., 2007). Hsp27 regola negativamente l'attivazione della procaspasi 9, sequestrando il citocromo c citosolico dopo il suo rilascio dal mitocondrio da Apaf1 ed in tal modo impedisce la formazione dell'apoptosoma (Arya R, et al., 2007). L'unico ruolo proapoptotico noto ad oggi di Hsp27 è che aumenta l'apoptosi indotta da TNF inibendo la degradazione di I-kB, impedendo la sopravvivenza della cellula mediata da NF-kB (Arya R, et al., 2007).

Sembra che una parte del network di interazioni di *ISWI* comprenda geni codificanti proteine coinvolte nel mantenimento del potenziale ossidoriduttivo ed energetico della cellula. Due interattori genetici di *ISWI* isolati in entrambi gli screening sono *CG14508*, un gene che codifica per trasportatore di elettroni del complesso CoQH2-citocromo C e *CG7560*, un gene che codifica per una NADPH-reduttasi. Altri interattori da me isolati coinvolti nel metabolismo basale cellulare sono *aralar1*, un gene che codifica un trasportatore lipidico mitocondriale; *blot*, un gene che codifica una proteina coinvolta nella sintesi dell'ATP; *CG7430*, un gene il cui prodotto è una proteina legante il FAD coinvolta nel ciclo degli acidi tricarbossilici; *Mdh*, un gene che codifica per la malato deidrogenasi. È interessante notare inoltre che mutazioni nel gene che codifica per la PARP interagiscono nello screening ISWIK159R (Burgio G, et al., 2008) La PARP promuove l'apoptosi principalmente depauperando le riserve di NADH della cellula e facendo quindi cadere la stessa in una crisi energetica irreversibile che porta a morte apoptotica (Heeres JT, Hergenrother PJ., 2007). *ISWI* è una proteina estremamente abbondante all'interno del nucleo (Corona DFV, Tamkun JW, 2004), è stato calcolato che v'è circa una molecola di *ISWI* per nucleosoma. Si può ipotizzare un modello in cui *ISWI* possa monitorare il livello energetico della cellula, ad esempio utilizzando costantemente l'energia di idrolisi dell'ATP per mantenere inattivi determinati promotori, inclusi alcuni di geni proapoptotici. Nell'eventualità di una drammatica crisi energetica della cellula, tale da dover promuovere la morte per apoptosi, *ISWI* potrebbe funzionare da sensore della carenza energetica ed in tal modo non essere più in grado di mantenere in uno stato inattivo i promotori dei geni proapoptotici e di conseguenza promuovere la morte cellulare.

La *Tankirasi* (Seimiya H, 2006), un omologo della PARP, è un altro degli interattori isolati nello screening; la tankirasi svolge le sue funzioni a livello del telomero (Seimiya H, 2006). I telomeri sono i complessi DNA-proteine alle estremità dei cromosomi eucariotici. I telomeri sono distinti dalle rotture a doppio filamento del DNA, che provocherebbero unione non omologa delle estremità o ricombinazione omologa. Il macchinario di replicazione non è in grado di replicare le estremità del DNA stesso, e questo provocherebbe una perdita graduale di DNA alle estremità ad ogni ciclo di replicazione, a meno che nuovo DNA non sia sintetizzato ad ogni ciclo di replicazione ad opera della telomerasi nei mammiferi (Seimiya H, 2006) o di un meccanismo di retrotrasposizione in *Drosophila* (Biessmann H et al., 2005). La quantità di DNA aggiunto ad ogni ciclo di replicazione è bassissimo, generalmente al di sotto del livello di analisi. Telomeri accorciati in modo massivo sono riconosciuti come danno al DNA e questo porta alla senescenza cellulare replicativa. I telomeri sono spesso considerati come gli orologi mitotici che determinano il potenziale replicativo di cellule non immortalizzate. In contrasto con ciò, il 90% delle cellule trasformate hanno alti livelli di attività della telomerasi per mantenere la lunghezza dei telomeri. La telomerasi umana consiste di un RNA stampo (TR) e di una subunità catalitica (TERT), la cui espressione è il fattore limitante per l'attività del complesso. L'espressione della TERT si correla positivamente con l'immortalizzazione e la carcinogenesi (Seimiya H, 2006). L'introduzione di dominanti negativi per la TERT in cellule cancerose riduce la lunghezza dei telomeri e promuove di conseguenza la morte per apoptosi. L'attivazione della telomerasi da parte delle cellule cancerose evita in modo efficiente la senescenza replicativa. In modo coerente con ciò, la telomerasi è stata considerata un potenziale bersaglio per terapie farmacologiche contro il cancro e sono stati sviluppati diversi inibitori della telomerasi da usare in terapia. La tankirasi è una proteina che possiede un dominio omologo alla PARP che catalizza la poli-ADP-ribosilazione di proteine bersaglio usando il NADH come substrato. TRF1 è una proteina che riconosce il telomero ed impedisce l'accesso della telomerasi al telomero. TRF1 è poli-ADP-ribosilata dalla tankirasi e questa modificazione provoca il rilascio dal telomero della TRF1 (Seimiya, H., 2006). La TRF1 così rilasciata è a sua volta ubiquitinata ed avviata alla degradazione proteasomiale (Seimiya H, 2006). Coerentemente, l'allungamento del telomero è indotto da una overespressione della tankirasi (Seimiya H, 2006). In tal modo, la tankirasi lavora come regolatore positivo per

l'allungamento mediato dalla telomerasi. Esperimenti fatti utilizzando contemporaneamente inibitori dell'attività della telomerasi ed inibitori dell'attività della tankirasi hanno manifestato un potente effetto sinergico, suggerendo importanti potenziali risvolti in terapia (Seimiya H, 2006).

È verosimile ipotizzare inoltre che una alterata struttura cromatinica causata dalla perdita di funzione di ISWI possa influenzare in vario modo l'allungamento e la stabilità del telomero. In quest'ottica, il telomero diviene punto su cui convergono diversi pathway regolativi della struttura e della topologia della cromatina ed in tal modo può essere considerato come sensore del "benessere" della cromatina stessa. Sempre in quest'ottica, alterazioni della struttura del telomero danno segnali di morte alla cellula per evitare che alterazioni topologiche possano causare instabilità genomica, siano esse dovute alla senescenza cellulare o per danno irreversibile alla cromatina. Non è sicuramente casuale che la maggior parte delle forme tumorali debba possedere meccanismi molecolari atti a preservare il telomero per sfuggire alla morte per senescenza cellulare. Inoltre dati prodotti all'interno del laboratorio in cui ho svolto la mia tesi hanno dimostrato che ISWI possa essere bersaglio di poli-ADP-ribosilazione e che questo evento ne riduca drammaticamente l'affinità per la cromatina (Sala A, et al., 2008). Ciò suggerisce una possibile interazione tra la tankirasi ed ISWI dove la tankirasi poli-ADP-ribosila ISWI e ne regola le funzioni a livello del telomero. Se ciò fosse vero, ISWI potrebbe divenire un altro bersaglio farmacologico per la terapia antitumorale che cerca di uccidere le cellule trasformate inducendo morte per apoptosi indotta da danno al telomero e senescenza cellulare.

Tra gli interattori isolati voglio evidenziare *Atx2* (Satterfield TF, Pallanck LJ, 2006) un gene le cui mutazioni dell'omologo umano sembrano coinvolte in una malattia a trasmissione genetica (Ataxia teleangectasica) ed il gene della sindrome di Angelman (Lalande M, Calciano MA, 2007), una ubiquitina ligasi le cui mutazioni od incorretto imprinting dell'omologo umano sono alla base della sindrome omologa. Sembra inoltre che in uomo, una parte del fenotipo riscontrato nella sindrome di Williams-Beuren sia dovuta ad una alterata funzione dell'omologo umano di ISWI (Poot, R. A, et al., 2004). Questi dati suggeriscono un possibile ruolo di ISWI nella patogenesi di alcune sindromi umane geneticamente trasmissibili.

Un'altra classe di interattori isolati nello screening ha messo in evidenza possibili network funzionali tra i modificatori covalenti della cromatina ed ISWI, suggerendo che le due classi di rimodellatori della cromatina, quelli covalenti e quelli ATP-dipendenti, possano lavorare in concerto per regolare l'accessibilità del genoma. Sono un modificatore covalente della cromatina (*trx*) (Iizuka M, Smith MM, 2002; Jenuwein T, Allis CD, 2001; Turner BM, 2002) ed un gene che codifica un fattore che riconosce modifiche covalenti della cromatina (*mbf1*) (Takemaru K, et al., 1997). *trx* è un gene che codifica per una H3-K4 metiltrasferasi, mentre *mbf1* è un gene che codifica per una proteina che lega zone di DNA con isole CpG metilate. Dai dati del mio screening e dai dati ottenuti nel mio laboratorio sulle interazioni tra le HDAC, la PARP ed ISWI (Burgio G, et al., 2008; Sala A, et al., 2008) risulta altamente probabile che i rimodellatori della cromatina ATP-dipendenti ed i modificatori covalenti possano lavorare in concerto per gestire in modo dinamico e regolato la topologia della cromatina. Credo che la comprensione dei meccanismi di rimodellamento della cromatina possa avvenire solo comprendendo il network di interazione tra le diverse famiglie di rimodellatori. La comprensione di questo network credo sia di grande importanza biologica.

Un'altra classe di interattori ISWI-EGUF corrisponde a geni coinvolti a vario titolo nella trasduzione del segnale (Tabella 3).

GENE	FUNZIONE
<i>CG10426</i>	Fosfatasi dell'inositolo trifosfato
<i>CG31745</i>	Trasduzione del segnale mediata dal calcio
<i>CG7420</i>	Fattori di scambio delle piccole proteine G
<i>mbc</i>	Fattori di scambio delle piccole proteine G
<i>Madm</i>	Serina-treonina chinasi
<i>SNF4Aγ</i>	Serina-treonina chinasi
<i>wdb</i>	Serina-treonina chinasi
<i>Doa</i>	Serina-treonina chinasi coinvolta nella cascata delle MAP chinasi
<i>dsd</i>	Adesione cellula-cellula
<i>Tsp96F</i>	Adesione cellula-cellula
<i>Gap1</i>	Attivatore dell'attività GTPasica di Ras
<i>Lk6</i>	Serina-treonina chinasi
<i>MKP3</i>	Fosfatasi delle MAP chinasi
<i>RhoGAP68F</i>	Fattore che promuove l'attività GTPasica della proteina Rho
<i>RhoL</i>	Proteina simile a Rho

Tabella 3. Geni coinvolti nella traduzione del segnale isolati nello screening ISWI-EGUF. Nella prima colonna riporto il nome del gene. Nella seconda colonna riporto brevemente la funzione del prodotto genico.

Queste classi di geni codificano per proteine le cui mutazioni sono da lungo tempo a vario titolo associate alla trasformazione neoplastica (Dreesen O, Brivanlou AH, 2007). Storicamente le proteine G e la loro corte di attivatori e repressori insieme alla cascata delle MAP chinasi ed alle proteine coinvolte nella trasduzione del segnale sono state tra le prime attività associate alla proliferazione cellulare deregolata ed alla carcinogenesi (Dreesen O, Brivanlou AH, 2007). Questa classe di interattori è molto rappresentata all'interno del mio screening. È altamente probabile che ISWI possa essere uno degli effettori finali dei pathway di cui sopra, in un modo probabilmente conservato anche dal punto di vista evolutivo, difatti è stata dimostrata in *Caenorabditis elegans* interazione genetica tra l'omologo di *ISWI* ed il pathway di *Ras* (Andersen EC, et al., 2006). I miei dati suggeriscono che ISWI possa essere un effettore nucleare del segnale trasdotto dalla membrana plasmatica e che potrà divenire, come le altre proteine facenti parte di questi pathway, un potenziale target terapeutico per la terapia antitumorale.

CONCLUSIONI

Lo screening che ho condotto tramite metodiche di genetica diretta ed inversa ha permesso l'isolamento non solo di proteine che lavorano in concerto con ISWI, ma anche in antagonismo. Nonostante l'elevata stringenza utilizzata nello screening, sono state isolate diverse classi di interattori, molte delle quali costituite da geni coinvolti a vario titolo in processi strettamente correlati con il mantenimento della stabilità genomica, con la regolazione del ciclo cellulare e dei processi apoptotici, con la dinamica della topologia della cromatina stessa. In definitiva con processi che, se deregolati, sono strettamente correlati alla carcinogenesi.

Il passo successivo di questo studio riguarderà la caratterizzazione molecolare delle interazioni genetiche evidenziate. Sicuramente sarà un lavoro che richiederà un notevole sforzo, ma è molto probabile che i dati ottenuti potranno aumentare le conoscenze sul ruolo dei rimodellatori della cromatina nella trasformazione tumorale. I dati del mio screening indicano ISWI come punto su cui possono convergere diversi pathway regolativi dove ISWI ed i complessi di cui fa parte siano gli effettori finali dell'integrazione di network regolativi cellulari. Se è vero che i rimodellatori della cromatina siano attori principali di processi quali la carcinogenesi o sindromi a base genetica umane, una aumentata conoscenza del loro network regolativo e funzionale potrà portare enormi innovazioni sia per la diagnosi che per la cura di queste patologie.

BIBLIOGRAFIA

Andersen EC, Lu X, Horvitz HR.

C. elegans ISWI and NURF301 antagonize an Rb-like pathway in the determination of multiple cell fates. *Development*. 2006 Jul;133(14):2695-704. Epub 2006 Jun 14.

Arya R, Mallik M, Lakhota SC.

Heat shock genes - integrating cell survival and death.

J Biosci. 2007 Apr;32(3):595-610.

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 May;25(1):25-9.

Baylin SB, Ohm JE.

Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction?

Nat Rev Cancer. 2006 Feb;6(2):107-16.

Becker PB, Hörz W.

ATP-dependent nucleosome remodeling.

Annu Rev Biochem. 2002;71:247-73. Epub 2001 Nov 9.

Badenhorst P, Voas M, Rebay I, Wu C.

Biological functions of the ISWI chromatin remodeling complex NURF.

Genes Dev. 2002 Dec 15;16(24):3186-98.

Barbarotto E, Schmittgen TD, Calin GA.

MicroRNAs and cancer: profile, profile, profile.

Int J Cancer. 2008 Mar 1;122(5):969-77. Review.

Bellen HJ, Kooyer S, D'Evelyn D, Pearlman J.

The *Drosophila* couch potato protein is expressed in nuclei of peripheral neuronal precursors and shows homology to RNA-binding proteins.

Genes Dev. 1992 Nov;6(11):2125-36.

Biessmann H, Prasad S, Walter MF, Mason JM.

Euchromatic and heterochromatic domains at *Drosophila* telomeres.

Biochem Cell Biol. 2005 Aug;83(4):477-85. Review.

Brunner E, Brunner D, Fu W, Hafen E, Basler K.

The dominant mutation *Glazed* is a gain-of-function allele of *wingless* that, similar to loss of *APC*, interferes with normal eye development.

Dev Biol. 1999 Feb 15;206(2):178-88.

Burgio G, La Rocca G, Sala A, Arancio W, Collesano M, Sperling AS, Armstrong JJ, van Heeringen SJ, Logie C, Tamkun J W, Corona DFV.

Genetic identification of a network of factors functionally interacting with the nucleosome remodeling ATPase ISWI.

Paper submitted. (2008)

Cenci G, Rawson RB, Belloni G, Castrillon DH, Tudor M, Petrucci R, Goldberg ML, Wasserman SA, Gatti M.

UbcD1, a *Drosophila* ubiquitin-conjugating enzyme required for proper telomere behavior.

Genes Dev. 1997 Apr 1;11(7):863-75.

Corona DF, Armstrong JA, Tamkun JW.

Genetic and cytological analysis of *Drosophila* chromatin-remodeling factors.

Methods Enzymol. 2004;377:70-85.

Corona DF, Tamkun JW.

Multiple roles for ISWI in transcription, chromosome organization and DNA replication.
Biochim Biophys Acta. 2004 Mar 15;1677(1-3):113-9.

Corona DF, Siriaco G, Armstrong JA, Snarskaia N, McClymont SA, et al.

ISWI regulates higher-order chromatin structure and histone H1 assembly in vivo.
PLoS Biol 5: e232.

Deuring R, Fanti L, Armstrong JA, Sarte M, Papoulas O, Prestel M, Daubresse G, Verardo M, Moseley SL, Berloco M, Tsukiyama T, Wu C, Pimpinelli S, Tamkun JW.

The ISWI chromatin-remodeling protein is required for gene expression and the maintenance of higher order chromatin structure in vivo.
Mol Cell. 2000 Feb;5(2):355-65.

Dreesen O, Brivanlou AH.

Signaling pathways in cancer and embryonic stem cells.
Stem Cell Rev. 2007 Jan;3(1):7-17. Review.

Duronio RJ, O'Farrell PH.

Developmental control of the G1 to S transition in *Drosophila*: cyclin E is a limiting downstream target of E2F.
Genes Dev. 1995 Jun 15;9(12):1456-68.

Duronio RJ, O'Farrell PH, Xie JE, Brook A, Dyson N.

The transcription factor E2F is required for S phase during *Drosophila* embryogenesis.
Genes Dev. 1995 Jun 15;9(12):1445-55.

Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N.

Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?
Nat Rev Genet. 2008 Feb;9(2):102-14. Review.

Genovese S, Corona DFV.

A New Medium to Grow Live Insects.
European Patent: MI2007A001420 / 8145 PTIT. 2007

Grossmann S, Bauer S, Robinson PN, Vingron M.

Improved detection of overrepresentation of Gene-Ontology annotations with parent child analysis.
Bioinformatics. 2007 Nov 15;23(22):3024-31. Epub 2007 Sep 11.

Guo M, Jan LY, Jan YN.

Control of daughter cell fates during asymmetric division: interaction of Numb and Notch.
Neuron. 1996 Jul;17(1):27-41.

Hacker U, Nystedt S, Barmchi MP, Horn C, Wimmer EA.

piggyBac-based insertional mutagenesis in the presence of stably integrated P elements in *Drosophila*.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jun 24;100(13):7720-5. Epub 2003 Jun 11.

Haince JF, Rouleau M, Hendzel MJ, Masson JY, Poirier GG.

Targeting poly(ADP-ribosylation): a promising approach in cancer therapy.
Trends Mol Med. 2005 Oct;11(10):456-63. Epub 2005 Sep 8.

Heeres JT, Hergenrother PJ.

Poly(ADP-ribose) makes a date with death.
Curr Opin Chem Biol. 2007 Dec;11(6):644-53. Epub 2007 Oct 23.

Horn C, Offen N, Nystedt S, Häcker U, Wimmer EA.

piggyBac-based insertional mutagenesis and enhancer detection as a tool for functional insect genomics.
Genetics. 2003 Feb;163(2):647-61.

Iizuka M, Smith MM.

Functional consequences of histone modifications.
Curr Opin Genet Dev. 2003 Apr;13(2):154-60. Review.

Jenuwein T, Allis CD.
Translating the histone code.
Science. 2001 Aug 10;293(5532):1074-80. Review.

Jordan KC, Schaeffer V, Fischer KA, Gray EE, Ruohola-Baker H.
Notch signaling through tramtrack bypasses the mitosis promoting activity of the JNK pathway in the mitotic-to-endocycle transition of *Drosophila* follicle cells.
BMC Dev Biol. 2006 Mar 16;6:16.

Karim FD, Chang HC, Therrien M, Wassarman DA, Laverty T, Rubin GM.
A screen for genes that function downstream of Ras1 during *Drosophila* eye development.
Genetics. 1996 May;143(1):315-29.

Kolmodin LA, Williams JF.
PCR. Basic principles and routine practice.
Methods Mol Biol. 1997;67:3-15.

Lalande M, Calciano MA.
Molecular epigenetics of Angelman syndrome.
Cell Mol Life Sci. 2007 Apr;64(7-8):947-60. Review.

Martens JA, Winston F.
Recent advances in understanding chromatin remodeling by Swi/Snf complexes.
Curr Opin Genet Dev. 2003 Apr;13(2):136-42.

Minucci S, Pelicci PG.
Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer.
Nat Rev Cancer. 2006 Jan;6(1):38-51. Review.

Moshkin YM, Mohrmann L, van Ijcken WF, Verrijzer CP.
Functional differentiation of SWI/SNF remodelers in transcription and cell cycle control.
Mol Cell Biol. 2007 Jan;27(2):651-61. Epub 2006 Nov 13.

Murawsky CM, Brehm A, Badenhorst P, Lowe N, Becker PB, Travers AA.
Tramtrack69 interacts with the dMi-2 subunit of the *Drosophila* NuRD chromatin remodelling complex.
EMBO Rep. 2001 Dec;2(12):1089-94. Epub 2001 Nov 21.

Niu H, Ye BH, Dalla-Favera R.
Antigen receptor signaling induces MAP kinase-mediated phosphorylation and degradation of the BCL-6 transcription factor.
Genes Dev. 1998 Jul 1;12(13):1953-61.

Norvell A, Kelley RL, Wehr K, Schüpbach T.
Specific isoforms of squid, a *Drosophila* hnRNP, perform distinct roles in Gurken localization during oogenesis.
Genes Dev. 1999 Apr 1;13(7):864-76.

Poot RA, Bozhenok L, van den Berg DL, Steffensen S, Ferreira F, Grimaldi M, Gilbert N, Ferreira J, Varga-Weisz PD.
The Williams syndrome transcription factor interacts with PCNA to target chromatin remodelling by ISWI to replication foci.
Nat Cell Biol. 2004 Dec;6(12):1236-44. Epub 2004 Nov 14.

Quinn LM, Dickins RA, Coombe M, Hime GR, Bowtell DD, Richardson H.
Drosophila Hfp negatively regulates dmyc and stg to inhibit cell proliferation.
Development. 2004 Mar;131(6):1411-23.

Reis T, Edgar BA.

Negative regulation of dE2F1 by cyclin-dependent kinases controls cell cycle timing.
Cell. 2004 Apr 16;117(2):253-64.

Roberts CW, Orkin SH.
The SWI/SNF complex--chromatin and cancer.
Nat Rev Cancer. 2004 Feb;4(2):133-42.

RØRTH P.

A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996 93:12418-12422

Ryder E, Ashburner M, Bautista-Llacer R, Drummond J, Webster J, Johnson G, Morley T, Chan YS, Blows F, Coulson D, Reuter G, Baisch H, Apelt C, Kauk A, Rudolph T, Kube M, Klimm M, Nickel C, Szidonya J, Maróy P, Pal M, Rasmuson-Lestander A, Ekström K, Stocker H, Hugentobler C, Hafen E, Gubb D, Pflugfelder G, Dorner C, Mechler B, Schenkel H, Marhold J, Serras F, Corominas M, Punset A, Roote J, Russell S.

The DrosDel deletion collection: a *Drosophila* genome-wide chromosomal deficiency resource.
Genetics. 2007 Sep;177(1):615-29. Epub 2007 Aug 24.

Ryoo HD, Bergmann A, Gonen H, Ciechanover A, Steller H.
Regulation of *Drosophila* IAP1 degradation and apoptosis by reaper and ubcD1.
Nat Cell Biol. 2002 Jun;4(6):432-8. Erratum in: Nat Cell Biol 2002 Jul;4(7):546.

Sala A, La Rocca G, Ferrari S, Burgio G, Tulin A, Corona DFV.
ISWI chromatin remodeling activity is regulated by poly-ADP- ribosylation.
Manuscript in Preparation (2008)

Satterfield TF, Pallanck LJ.
Ataxin-2 and its *Drosophila* homolog, ATX2, physically assemble with polyribosomes.
Hum Mol Genet. 2006 Aug 15;15(16):2523-32. Epub 2006 Jul 11.

Sparmann A, van Lohuizen M.
Polycomb silencers control cell fate, development and cancer.
Nat Rev Cancer. 2006 Nov;6(11):846-56.

Stahling-Hampton K, Ciampa PJ, Brook A, Dyson N.
A genetic screen for modifiers of E2F in *Drosophila melanogaster*.
Genetics. 1999 Sep;153(1):275-87.

Stowers RS, Schwarz TL.
A genetic method for generating *Drosophila* eyes composed exclusively of mitotic clones of a single genotype.
Genetics. 1999 Aug;152(4):1631-9.

Takemaru K, Li FQ, Ueda H, Hirose S.
Multiprotein bridging factor 1 (MBF1) is an evolutionarily conserved transcriptional coactivator that connects a regulatory factor and TATA element-binding protein.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Jul 8;94(14):7251-6.

Turner BM.
Cellular memory and the histone code.
Cell. 2002 Nov 1;111(3):285-91. Review.

Venkatesan RN, Treuting PM, Fuller ED, Goldsby RE, Norwood TH, Gooley TA, Ladiges WC, Preston BD, Loeb LA.
Mutation at the polymerase active site of mouse DNA polymerase delta increases genomic instability and accelerates tumorigenesis.
Mol Cell Biol. 2007 Nov;27(21):7669-82. Epub 2007 Sep 4.

Xi R, Xie T.
Stem cell self renewal controlled by chromatin remodeling factors.

Science. 2005 Dec 2; 310(5753):1487-9.

Woodcock CL.

Chromatin architecture.

Curr Opin Struct Biol. 2006 Apr;16(2):213-20. Epub 2006 Mar 15. Review.

Zhu L, Enders G, Lees JA, Beijersbergen RL, Bernards R, Harlow E.

The pRB-related protein p107 contains two growth suppression domains: independent interactions with E2F and cyclin/cdk complexes.

EMBO J. 1995 May 1;14(9):1904-13.

Zhu L, Enders GH, Wu CL, Starz MA, Moberg KH, Lees JA, Dyson N, Harlow E.

Growth suppression by members of the retinoblastoma protein family.

Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1994;59:75-84. Review.

Zrally CB, Marends DR, Dingwall AK.

SNR1 (INI1/SNF5) mediates important cell growth functions of the Drosophila Brahma (SWI/SNF) chromatin remodeling complex.

Genetics. 2004 Sep;168(1):199-214.