# Corso di
# Metodologie diagnostiche di Biochimica e di Biologia molecolare
## modulo di Biologia molecolare

A.A. 2012/2013

Michela A. Denti
denti@science.unitn.it

Lezione 4:
Telomeri. Riparazione e ricombinazione del DNA

**Lezione 4**

**(15 ottobre 2012)**

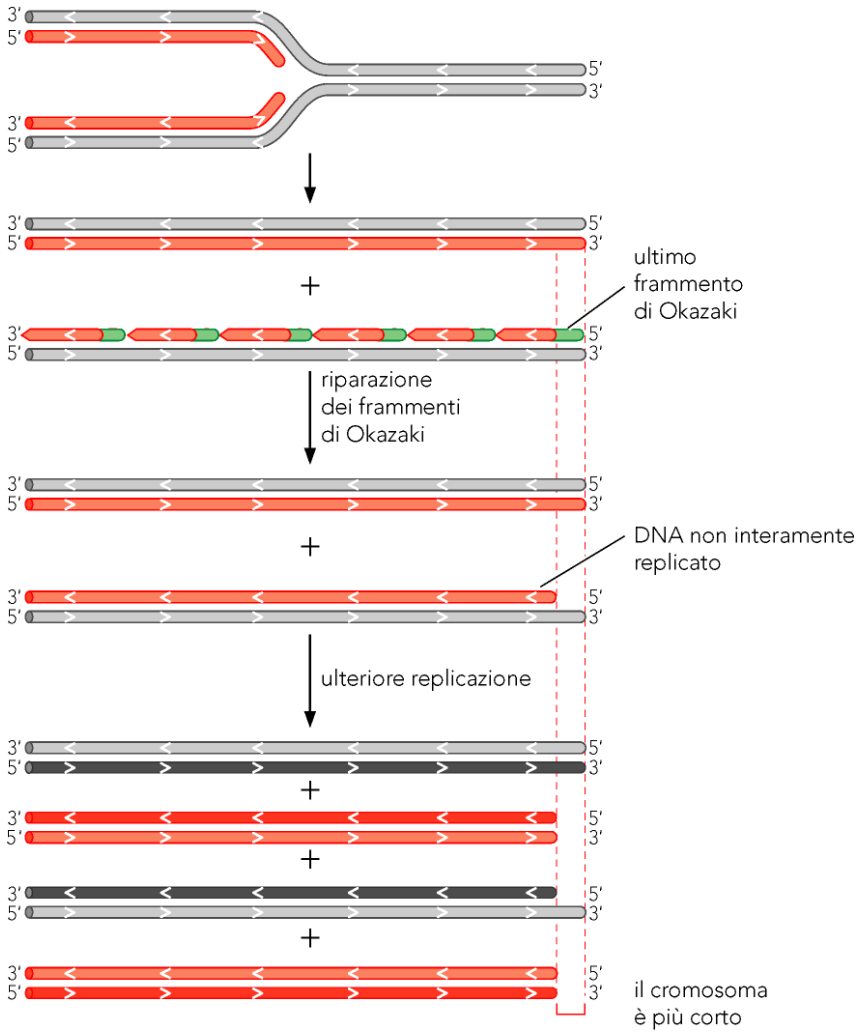
- Il mantenimento dei telomeri.
- La mutabilità e la riparazione del DNA
- La ricombinazione omologa

*Allison cap. 6, 7*

*Alberts cap. 5*

*Watson cap. 8, 9, 10*

## Il problema della replicazione delle estremità terminali

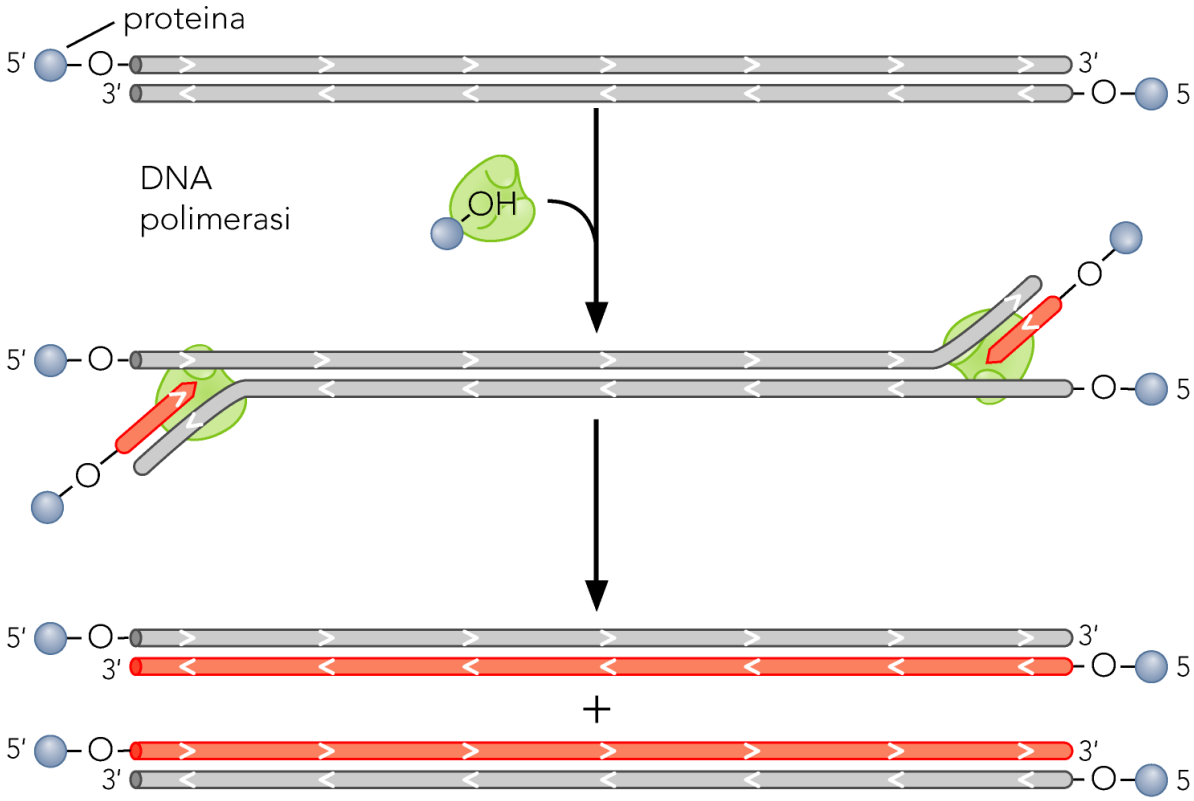



Quando la forcella di replicazione raggiunge l'estremità di un cromosoma lineare, non c'è uno stampo da usare per produrre l'innesco (primer) a RNA necessario a iniziare l'ultimo frammento di Okazaki all'estremità 3' del filamento ritardato

Ciò porterebbe ad una perdita di materiale genetico di generazione in generazione.

I batteri risolvono il problema usando molecole di **DNA circolare** come cromosomi

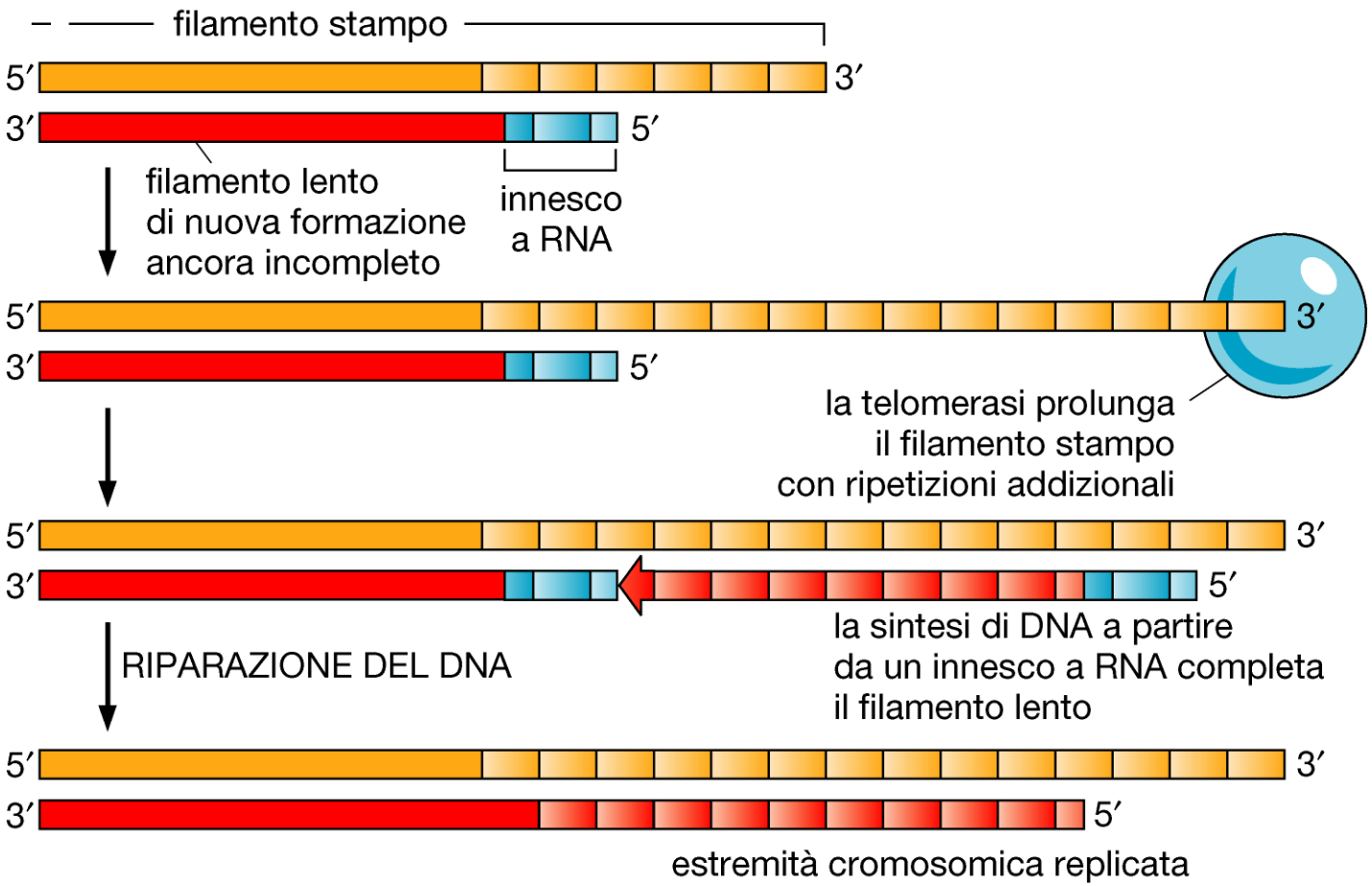
I virus usano una **proteina primer** che si lega covalentemente all'estremità 5'del DNA ed interagisce con la DNA polimerasi.
Un amminoacido fornisce un –OH in grado di rimpiazzare il 3'-OH normalmente fornito dal primer.



Gli eucarioti risolvono il problema in maniera ingegnosa: hanno delle sequenze nucleotidiche speciali all'estremità dei cromosomi, che sono incorporate nei **telomeri** ed attraggono un enzima chimato **telomerasi**

**I telomeri** sono formati da sequenze di DNA ripetute ricche in TG (es. telomeri umani: TTAGGG)

# Il mantenimento dei telomeri

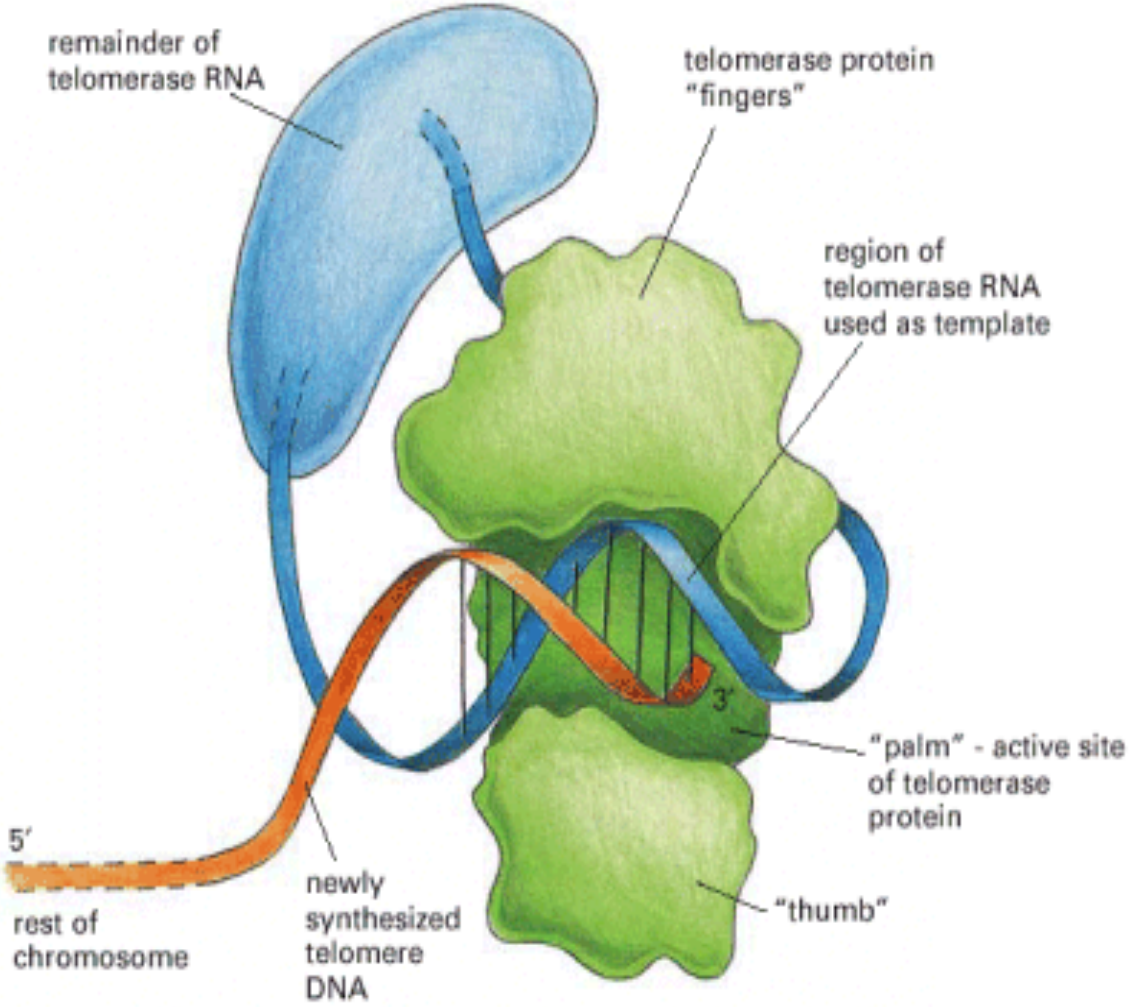


# La Telomerasi replica le estremità dei cromosomi

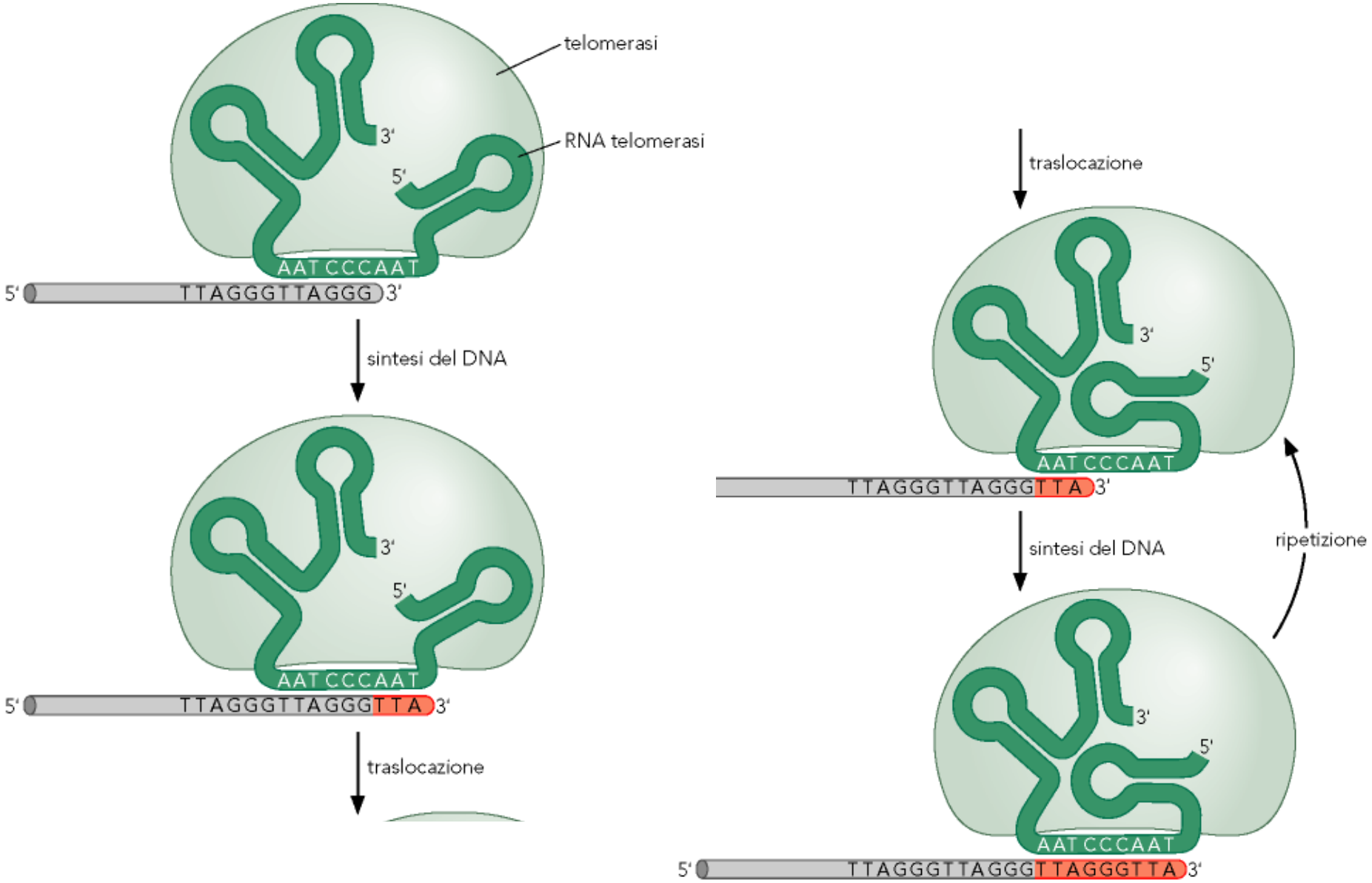
La telomerasi è un **complesso RNA-proteina** che porta uno stampo ad RNA per la sintesi di sequenze a DNA ripetute ricche in G

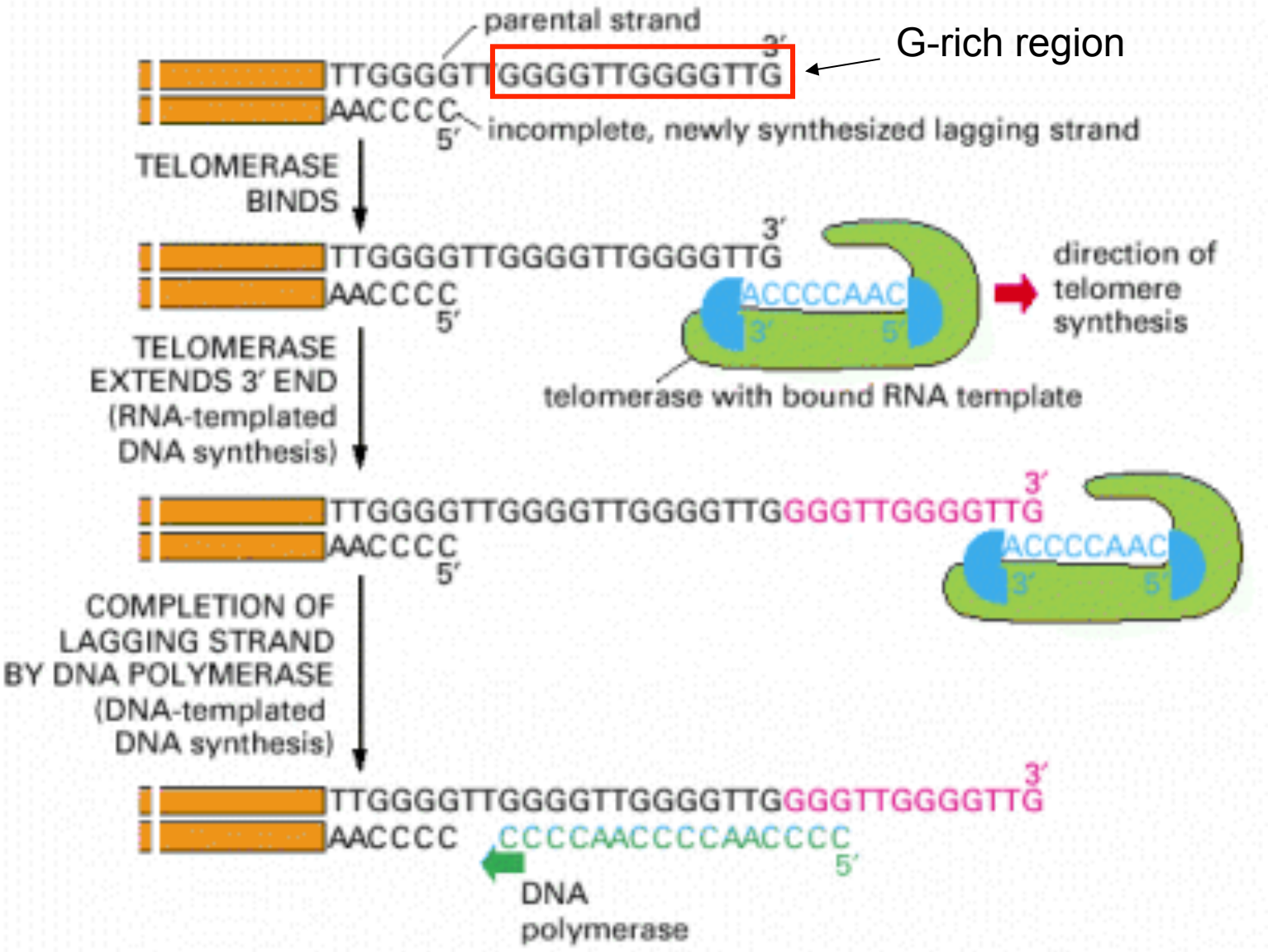
La telomerasi è una particolare **DNA polimerasi** che non richiede uno stampo esogeno.

La telomerasi è una **trascrittasi inversa** (*reverse transcriptase*)

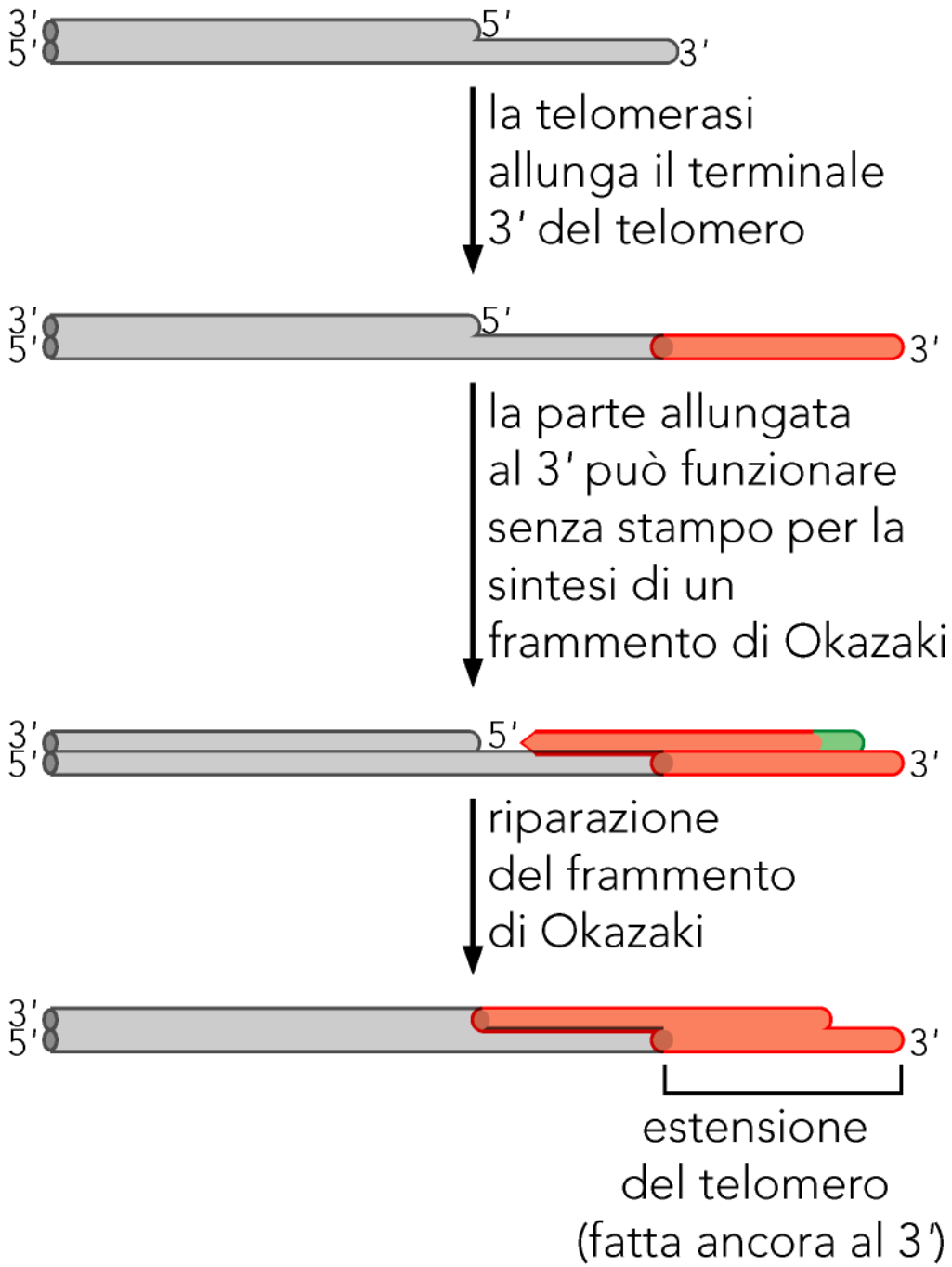



**La struttura della telomerasi**


telomerasi
RNA telomerasi
3'
5'
AAT CCCAAT
5'
TTAGGGTTAGGG
3'
sintesi del DNA
3'
5'
AAT CCCAAT
5'
TTAGGGTTAGGGTTA
3'
traslocazione
traslocazione
3'
5'
AAT CCCAAT
TTAGGGTTAGGGTTA
3'
sintesi del DNA
ripetizione
3'
5'
AAT CCCAAT
5'
TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTA
3'



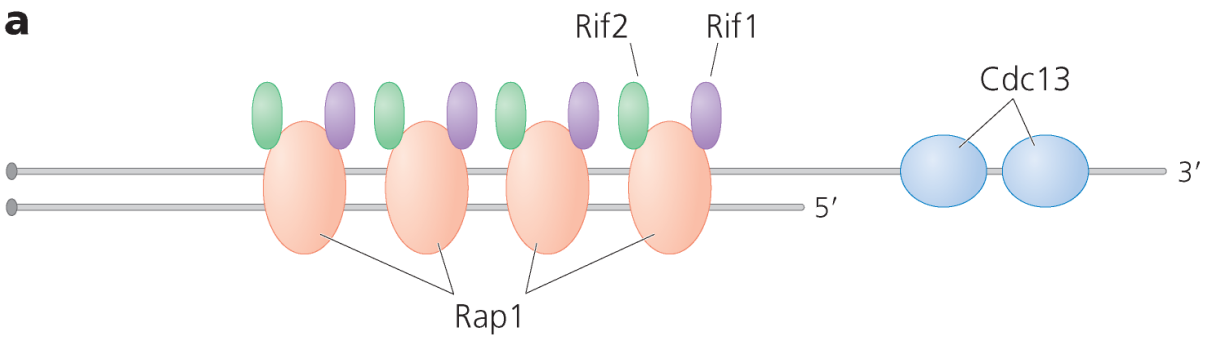

**Replicazione dei telomeri.** L'estremità 3′ del filamento di DNA parentale è estesa dalla sintesi di DNA che usa l'RNA come stampo. Questo permette di estendere il filamento copia in direzione 5'. Questo filemento ritardato è completato DNA polimerasi α, che ha attività DNA primasica.



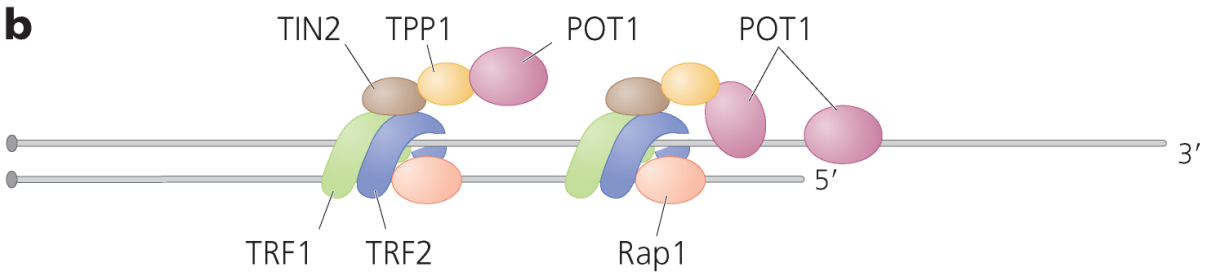

Watson et al., BIOLOGIA MOLECOLARE DEL GENE, Zanichelli editore S.p.A. Copyright © 2005

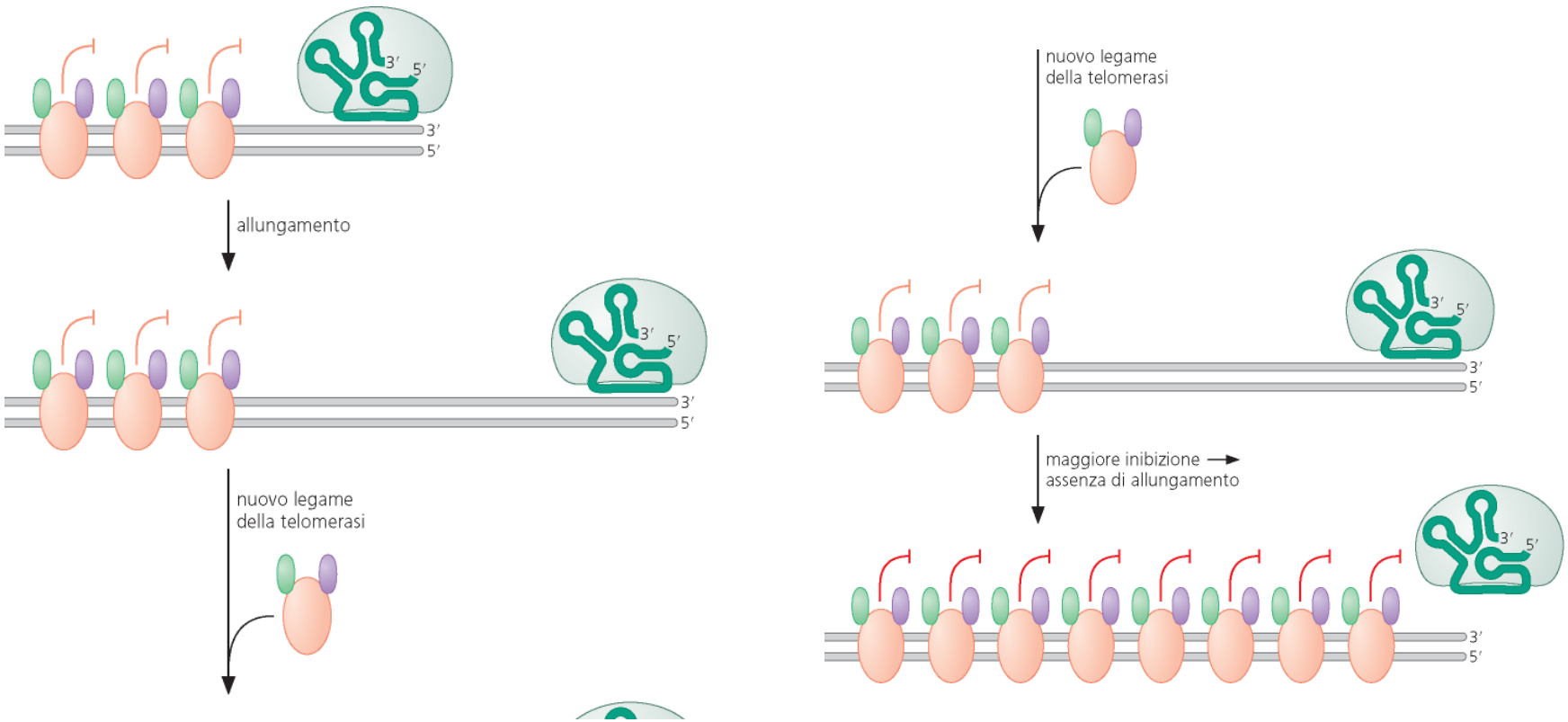
# Proteine che legano il telomero

*S. cerevisiae*




Uomo






Le proteine che legano il telomero influenzano l'attività telomerasica e la lunghezza del telomero

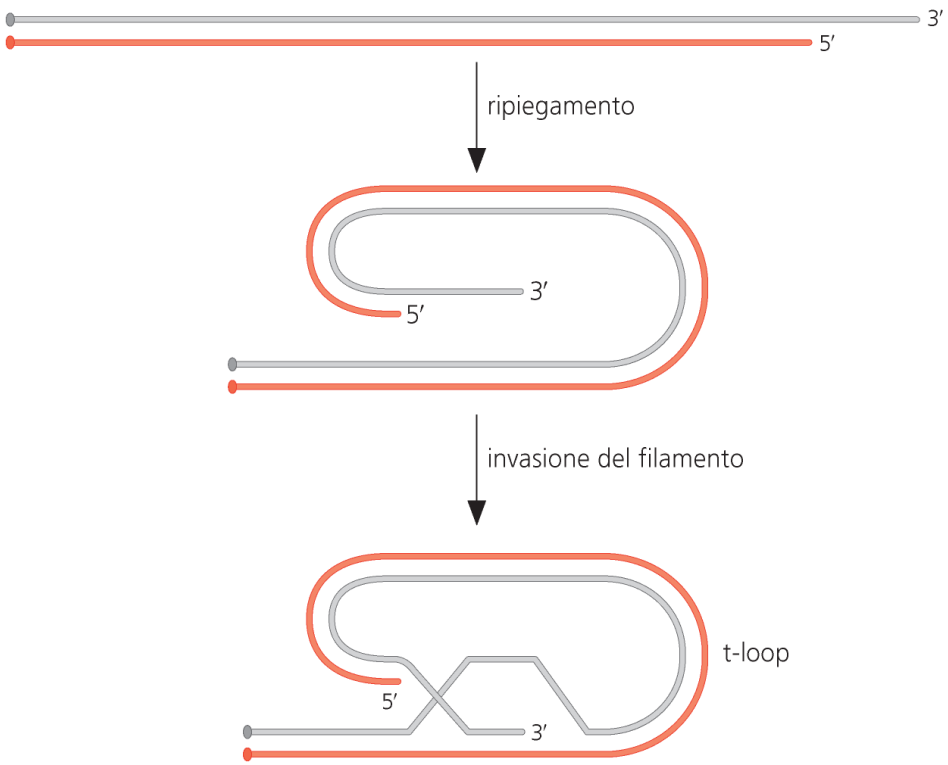
Le proteine che legano i telomeri hanno anche un ruolo fondamentale nella **protezione delle estremità dei cromosomi**.

Normalmente in una cellula la presenza di un'estremità di DNA viene interpretata come il segno di una rottura a doppio filamento e diventa bersaglio dell'apparato di **riparazione del DNA**.

Il risultato più frequente di questa riparazione consiste nell'avvio di eventi di **ricombinazione con altro DNA genomico** (nelle cellule diploidi questo avviene con la copia intatta del cromosoma danneggiato).

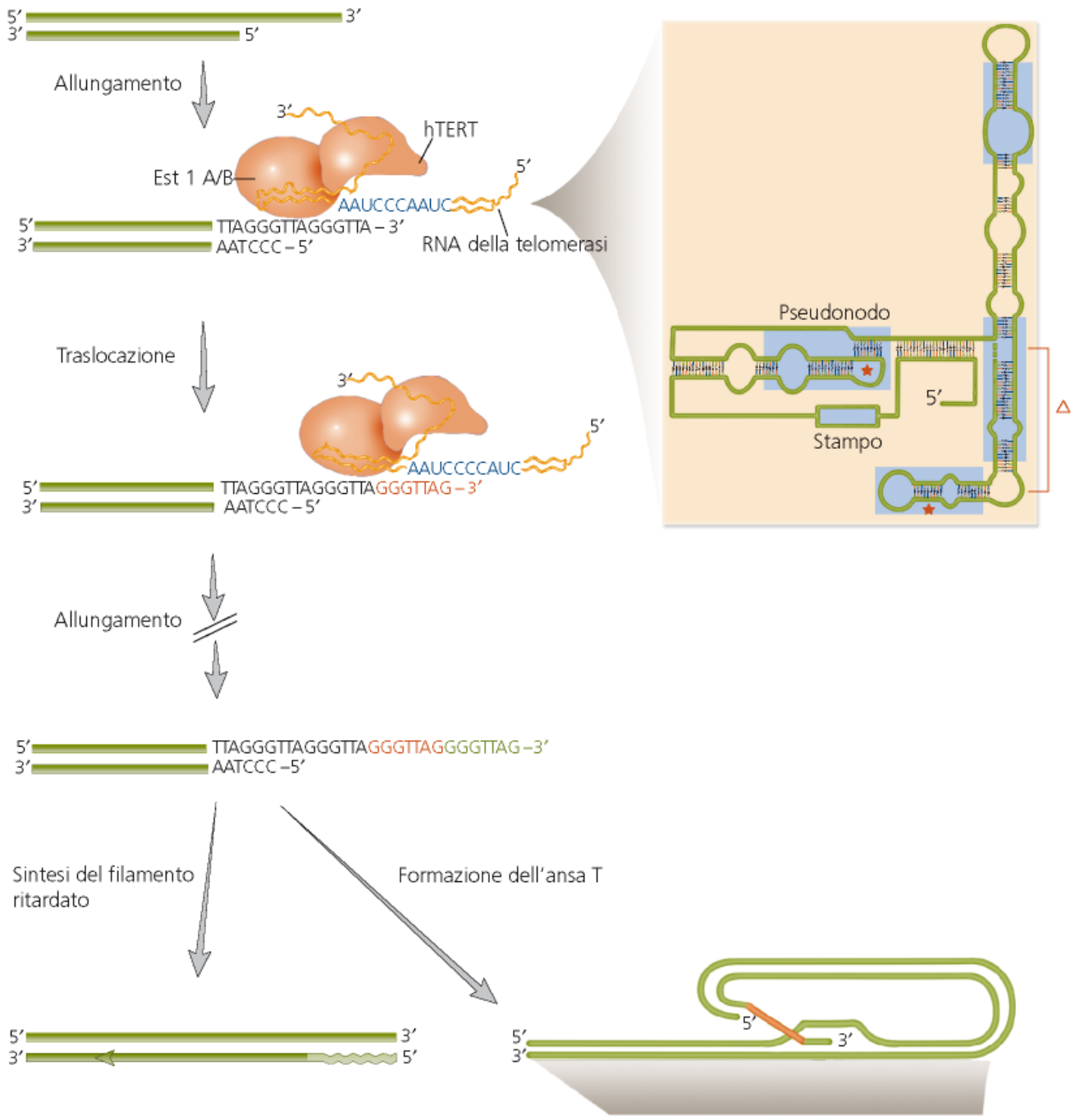
Mentre questa rappresenta la giusta risposta per le rotture casuali, sarebbe disastroso se i telomeri partecipassero agli stessi eventi: si produrrebbero degli eventi di **fusione** dei cromosomi.

# I telomeri formano una struttura ad ansa (*loop*)




La formazione dell’ansa T nasconde l’estremità del telomero.

Il progressivo accorciarsi dei telomeri rende più difficile la formazione dell’ansa T, rendendo più accessibile l’estremità 3’ del telomero alla telomerasi


5′
3′
3′
5′
Allungamento
3′
hTERT
Est 1 A/B
5′
AAUCCCAAUC
5′
TTAGGGTTAGGGTTA – 3′
3′
AATCCC – 5′
RNA della telomerasi
Pseudonodo
Traslocazione
3′
5′
AAUCCCCAUC
5′
TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAG – 3′
3′
AATCCC – 5′
5′
Stampo
Δ
Allungamento
5′
TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGGTTAG – 3′
3′
AATCCC – 5′
Sintesi del filamento ritardato
Formazione dell'ansa T
5′
3′
3′
5′
5′
3′
5′
3′

Si ipotizza che nelle cellule somatiche i telomeri possano rappresentare una sorta di orologio, un meccanismo che evita la proliferazione illimitata delle cellule nei tessuti adulti.

Secondo questa idea le nostre cellule somatiche originano con un numero massimo di ripetizioni telomeriche. In certi tessuti (pelle etc.) il gene per la telomerasi è “spento”, così ogni volta che una cellula si divide, perde parte delle sequenze telomeriche.
Dopo un cero numero di divisioni, le cellule figlie ereditano cromosomi difettivi (troppo corti) e cessano di dividersi, uscendo permanentemente dal ciclo cellulare.

**In teoria, un tale meccanismo può fornire una protezione dalla proliferazione incontrollata di cellule anormali nei tessuti somatici, e quindi dal cancro.**

**Questo meccanismo è responsabile dell'invecchiamento.**

Prove:

- Il DNA telomerico isolato da una persona giovane è più lungo di quello isolato da una persona più anziana

- Le cellule staminali e le cellule tumorali hanno attività telomerasica più elevata delle cellule normali

- L'espressione della telomerasi in cellule normali porta all'immortalizzazione delle cellule stesse.

- RÉVIVE®
  **PEAU MAGNIFIQUE**
  YOUTH RECRUIT **$1,500.00**
-

RéVive® Peau Magnifique Youth Recruit. Big words for even bigger results in bioengineered skincare. RéVive® continues to push the envelope further from the scalpel to the test tube. Peau Magnifique resets your skin's "aging clock". The results are indelible and life-changing.

RESULTS: Immediately, you will notice an increased glow with a robust appearance and a smoother, more even skin tone with reduced redness. Long term effects include firmer skin and increased clarity, with a reduction in the appearance of wrinkles.

SKIN TYPE: All skin types.

APPLICATION: PM application after cleansing and toning. Apply a one drop dose over the entire face. Use no other products simultaneously on the face area. Follow with PM eye and neck products. In the AM, resume your daily RéVive skincare regimen. Use one ampoule per week for four weeks of continuous treatment. Apply twice annually. Avoid eye area.

NET WT (4) 0.03 FL OZ / 1 M

-

**KEY INGREDIENTS**

**Telomerase:** Recruits a youthful skin by triggering a cascade of responses that contribute to a transformation of brand new skin cells.

**EGF [Epidermal Growth Factor]:** The "youth molecule" that is a bioengineered protein that dramatically increases skin cell renewal.

**FGF [Fibroblast Growth Factor]:** A bioengineered molecule that increases collagen, which firms the skin.

**Hyaluronic Acid:** A natural moisture binder.

# Riparazione del DNA

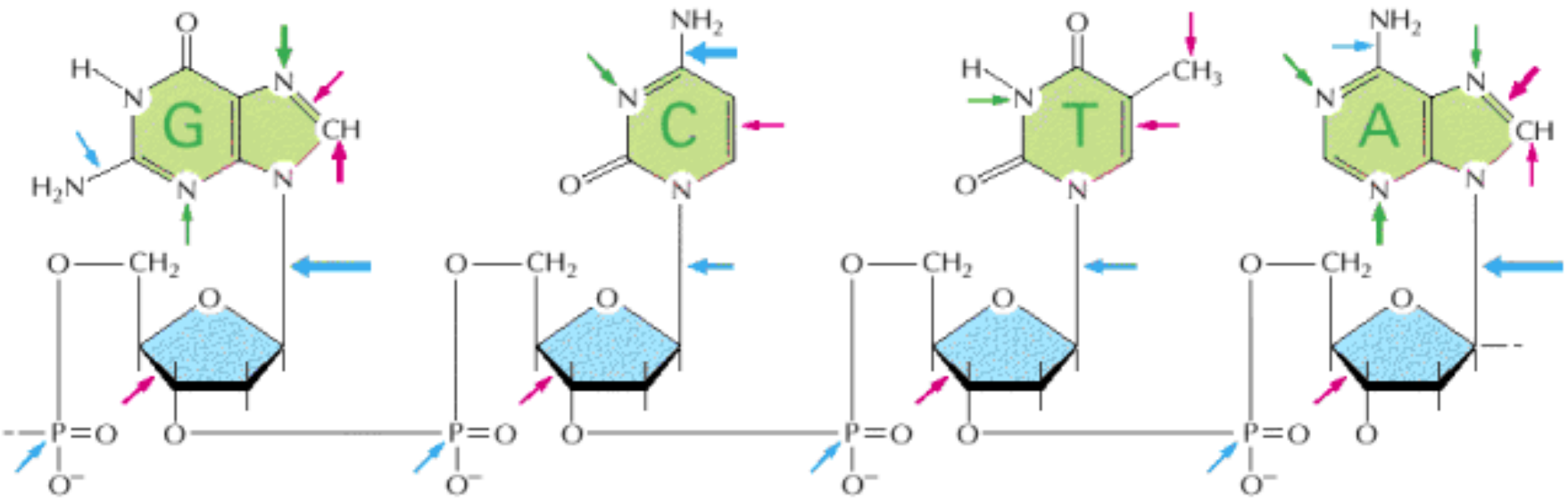
# Senza la riparazione del DNA il danno spontaneo al DNA cambierebbe rapidamente le sequenze.

Circa 5000 basi puriniche (adenina e guanina) vengono perse ogni giorno dal DNA di ciascuna cellula umana perché si idrolizzano i loro legami N-glicosilici al deossiribosio, una reazione spontanea chiamata **depurinazione**.

Una **deaminazione** spontanea della citosina a uracile avviene nel DNA al ritmo di circa 100 basi per cellula al giorno.

Le basi del DNA vengono anche occasionalmente danneggiate da un incontro con **metaboliti reattivi** prodotti nella cellula (comprese forme reattive dell'ossigeno) o per esposizione a sostanze chimiche presenti nell'ambiente.

Le **radiazioni ultraviolette** del sole possono produrre un legame covalente tra due pirimidine adiacenti nel DNA formando dimeri di pirimidine.



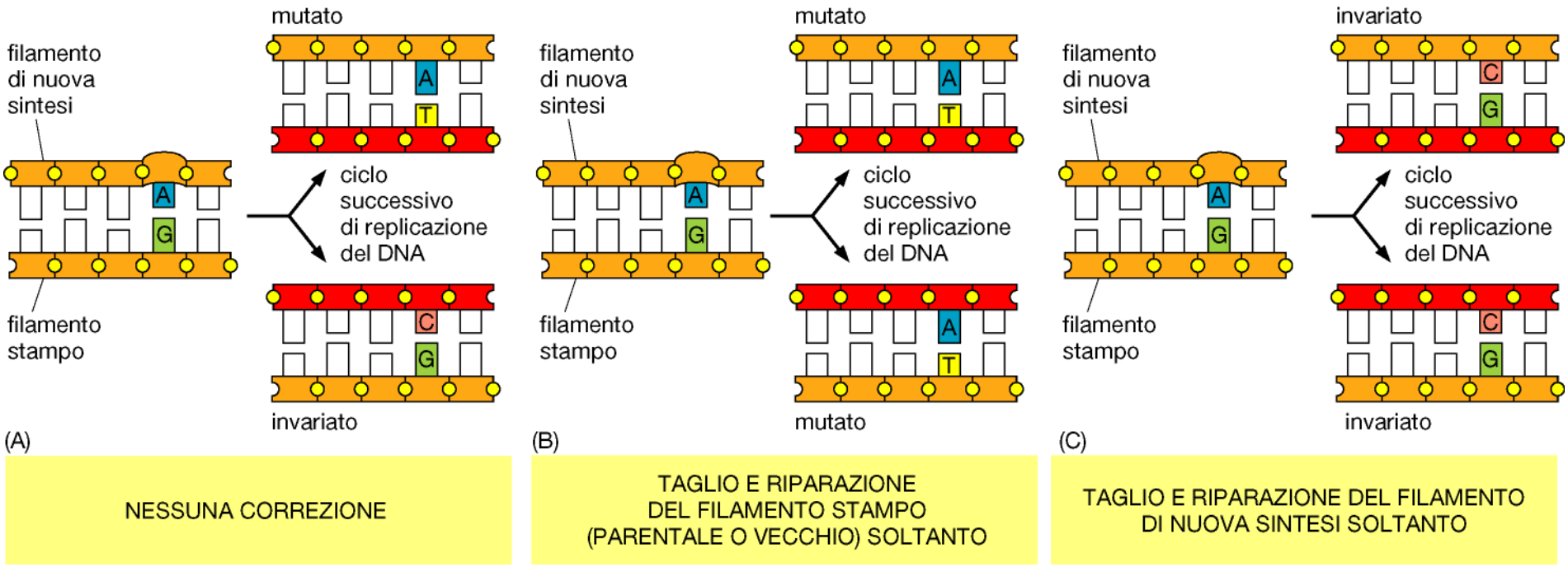

**Le alterazioni spontanee che richiedono riparazione del DNA.**

Danno ossidativo spontaneo

Attacco idrolitico

Metilazione incontrollata

(la larghezza di ciascuna freccia indica la frequenza relativa di ciascun evento)

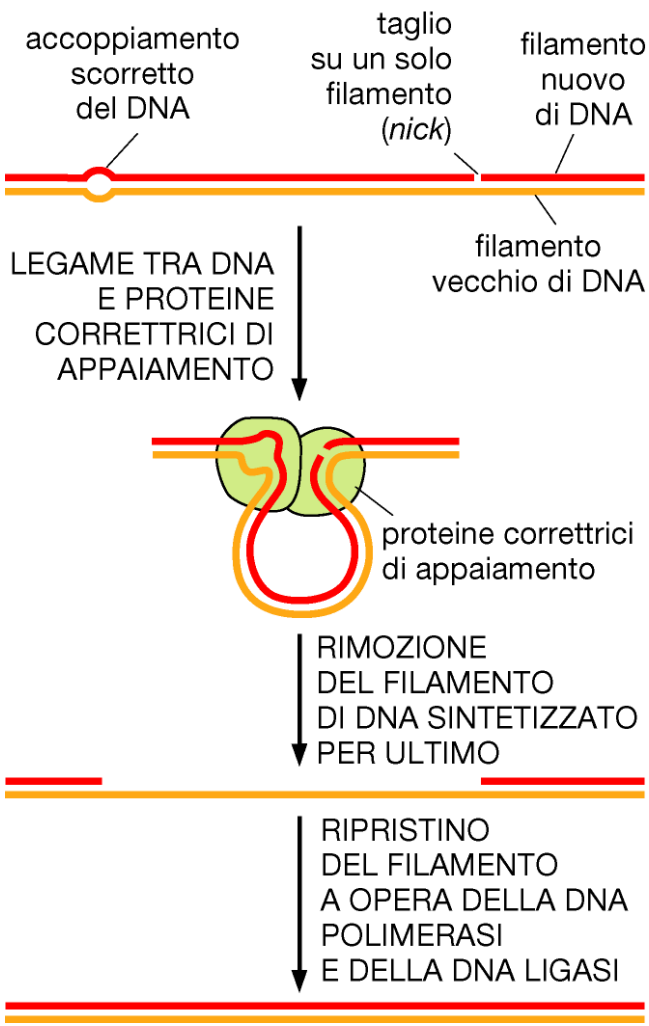



NESSUNA CORREZIONE

TAGLIO E RIPARAZIONE DEL FILAMENTO STAMPO (PARENTALE O VECCHIO) SOLTANTO

TAGLIO E RIPARAZIONE DEL FILAMENTO DI NUOVA SINTESI SOLTANTO

Alberts et al., L'ESSENZIALE DI BIOLOGIA MOLECOLARE DELLA CELLULA, Zanichelli editore S.p.A. Copyright © 2005



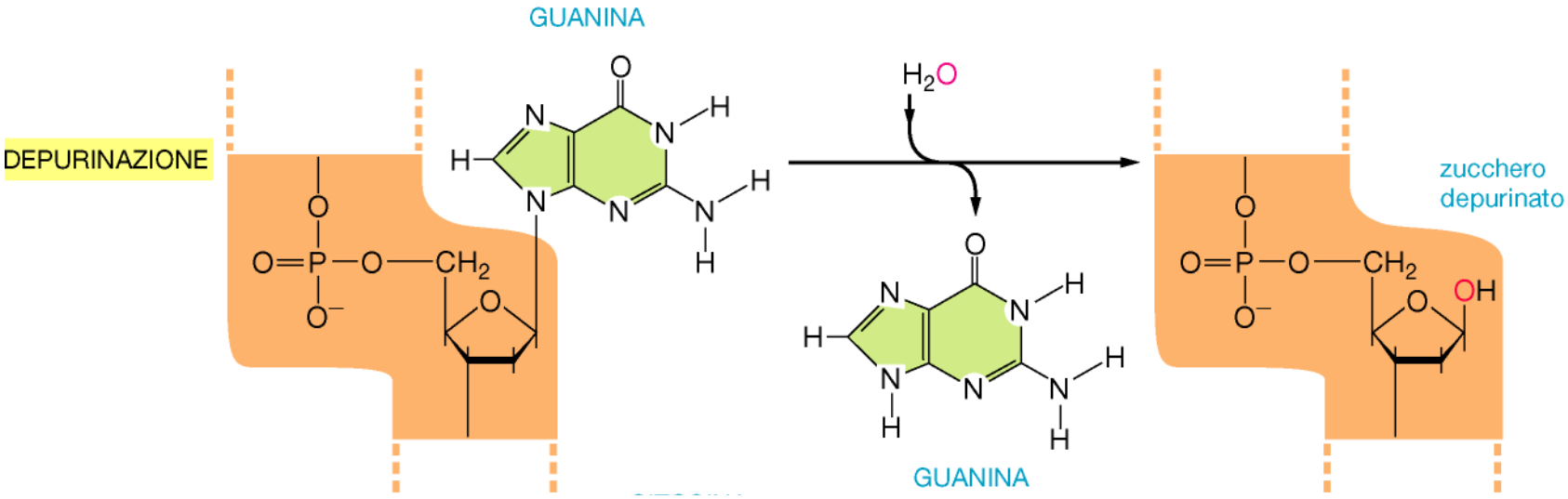

Le **proteine correttrici di appaiamento** rimediano agli errori occorsi durante la replicazione del DNA.

Un appaiamento sbagliato distorce la geometria della doppia elica. Le proteine correttrici di appaiamento individuano questa distorsione ed eliminano il DNA sintetizzato per ultimo.

Distinguono il filamento nuovo per la presenza di interruzioni (*nick*)

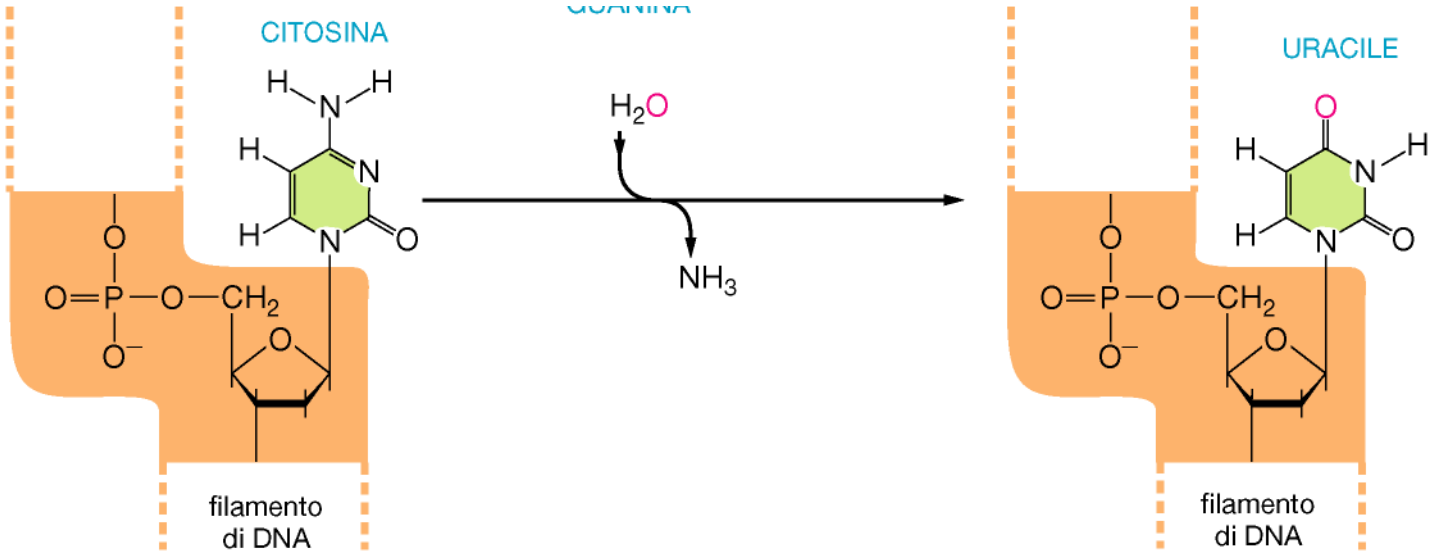
Alberts et al., L'ESSENZIALE DI BIOLOGIA MOLECOLARE DELLA CELLULA, Zanichelli editore S.p.A. Copyright © 2005

La **depurinazione** e la **deamminazione** sono note come le più frequenti reazioni chimiche che creano danni gravi al DNA cellulare




La **depurinazione** può staccare dal DNA sia la guanina che l'adenina

DEAMMINAZIONE

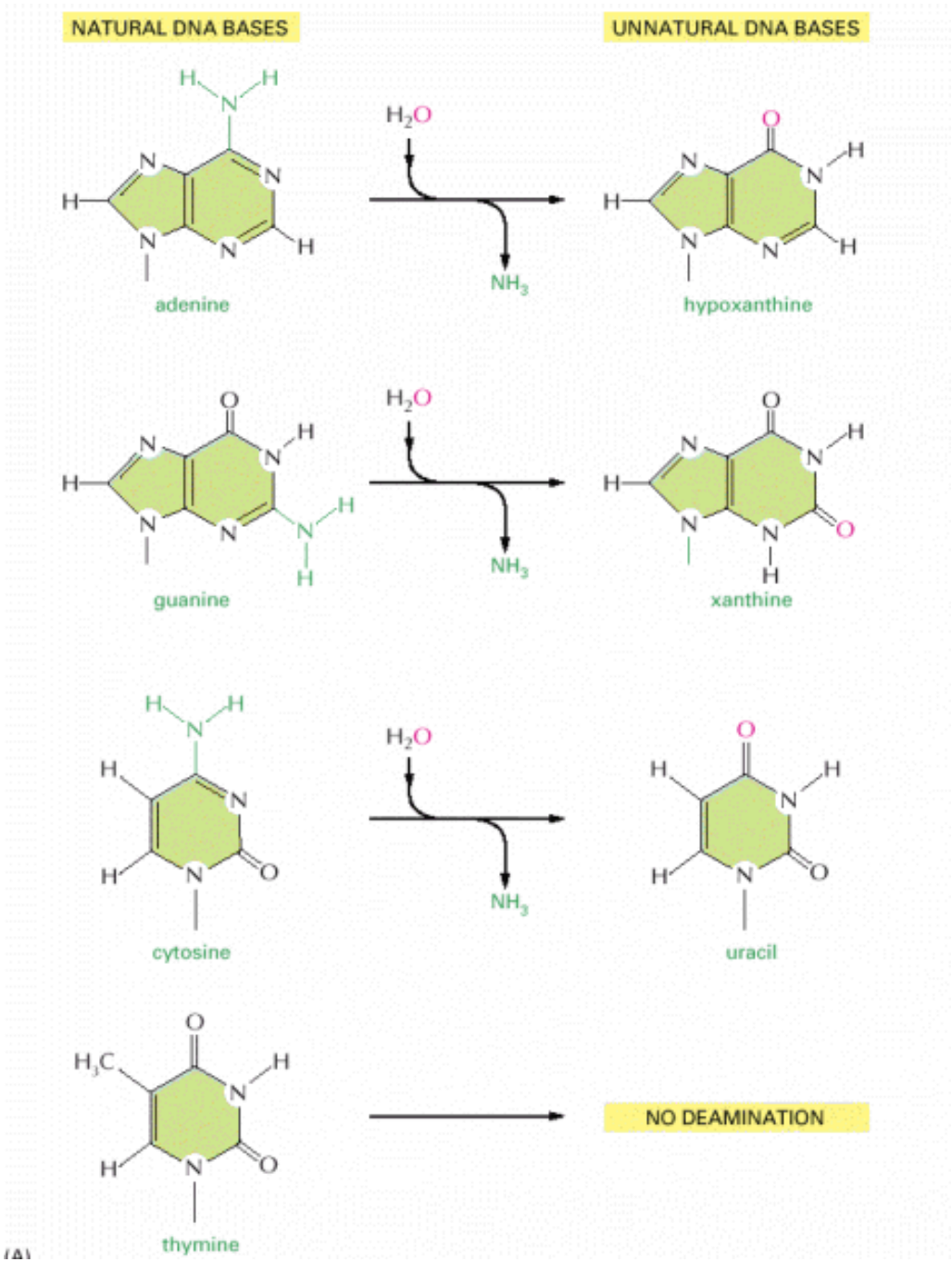


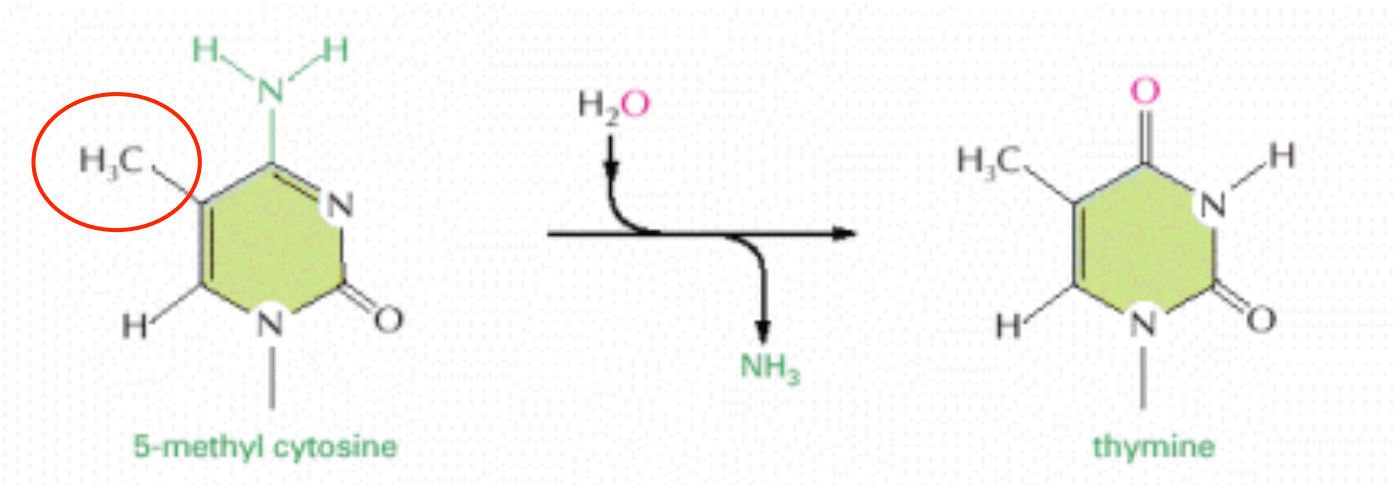

La **deamminazione** può colpire varie basi, ma nel caso più frequente trasforma la citosina in uracile, una base anomala nel DNA

Alberts et al., L'ESSENZIALE DI BIOLOGIA MOLECOLARE DELLA CELLULA, Zanichelli editore S.p.A. Copyright © 2005

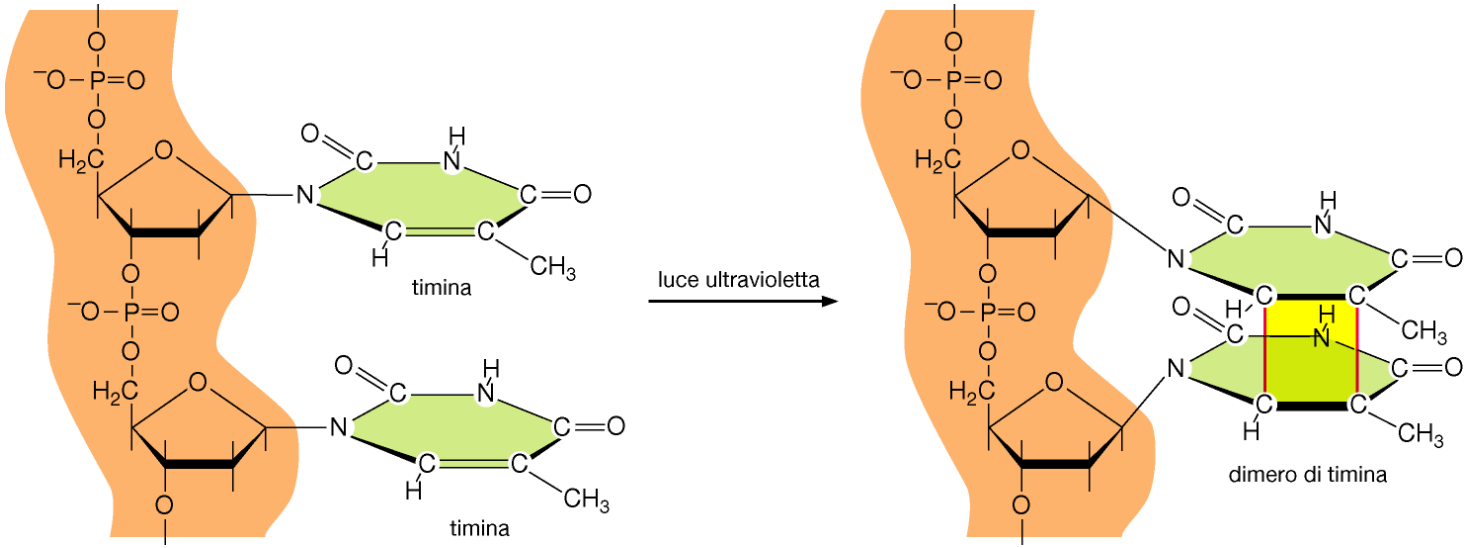
**La deaminazione dei nucleotidi del DNA.**

I prodotti della deaminazione spontanea di A e G sono riconoscibili come non naturali quando si trovano nel DNA e così sono facilmente riconosciuti e riparati.





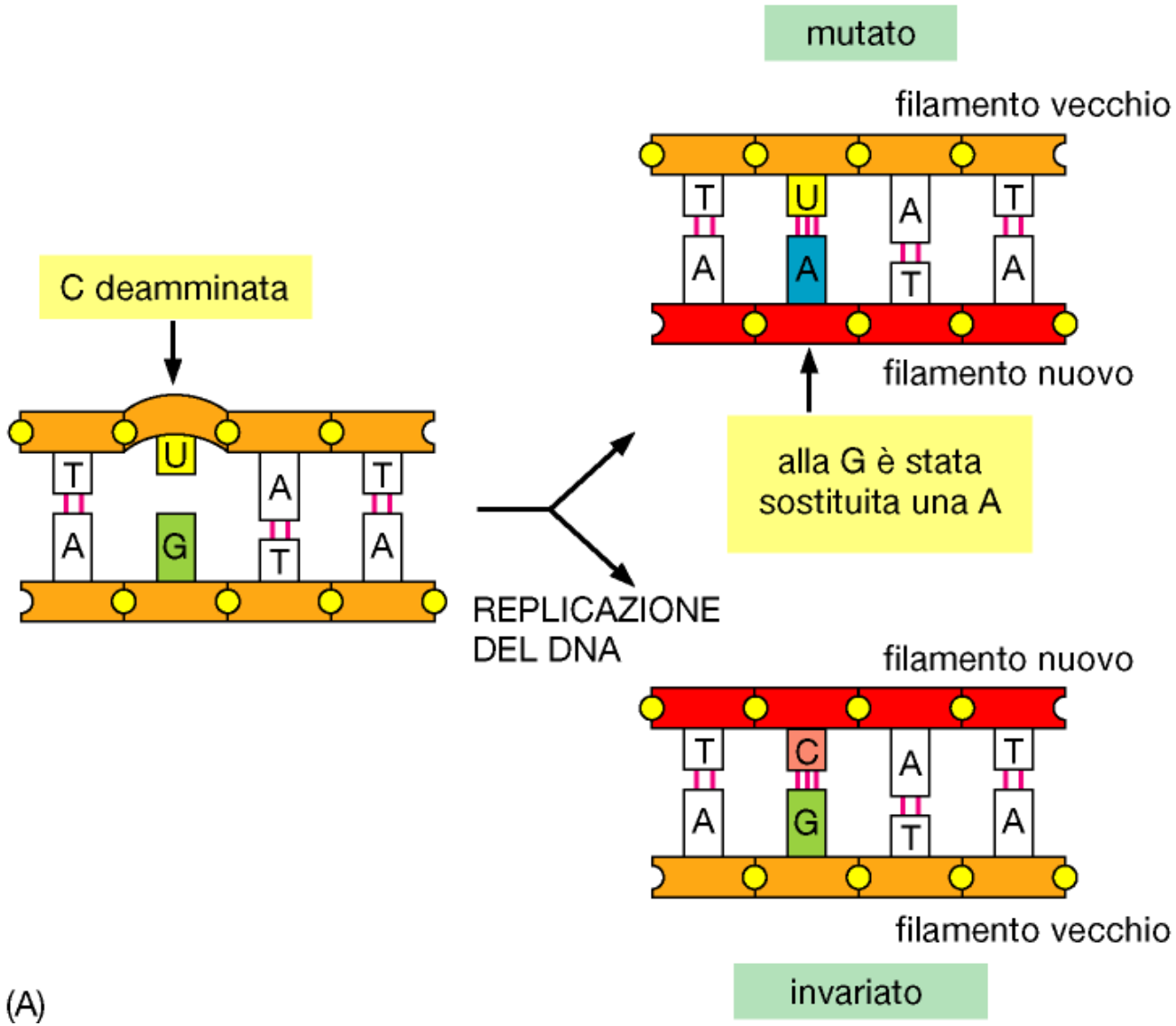

Circa il 3% dei nucleotidi C nel DNA dei vertebrati è metilato per aiutare a controllare l'espressione dei geni. Quando questi nucleotidi 5-metil C vengono accidentalmente deaminati, formano il nucleotide naturale T.



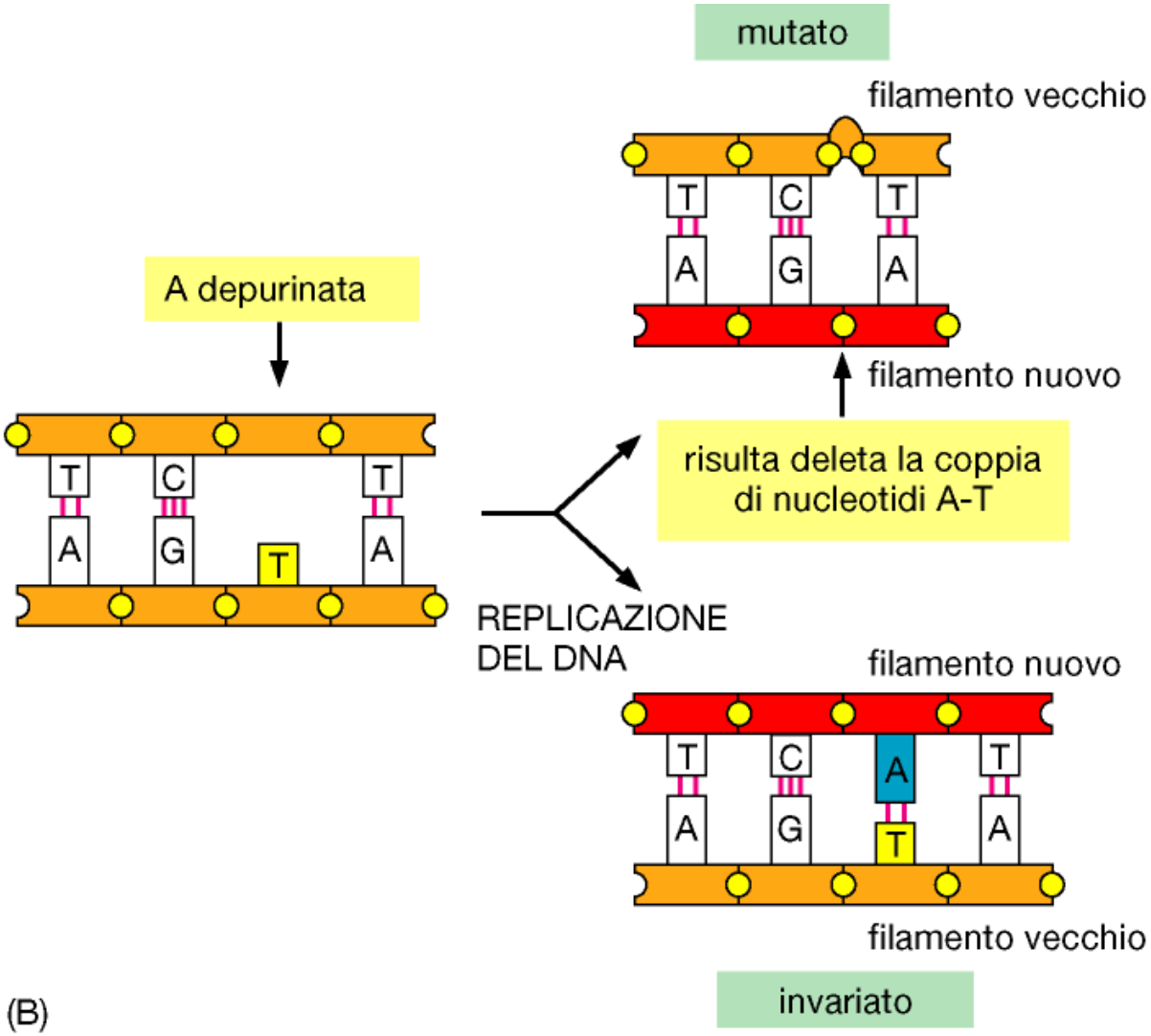

**La radiazione ultravioletta solare danneggia il DNA.**
Due timine adiacenti stabiliscono due legami covalenti e formano un **dimero di timina**.
Vanno particolarmente soggette a un danno di questo tipo le cellule cutanee esposte al sole.

Alberts et al., L'ESSENZIALE DI BIOLOGIA MOLECOLARE DELLA CELLULA, Zanichelli editore S.p.A. Copyright © 2005

Le modificazioni chimiche dei nucleotidi, se non riparate, danno origine a mutazioni

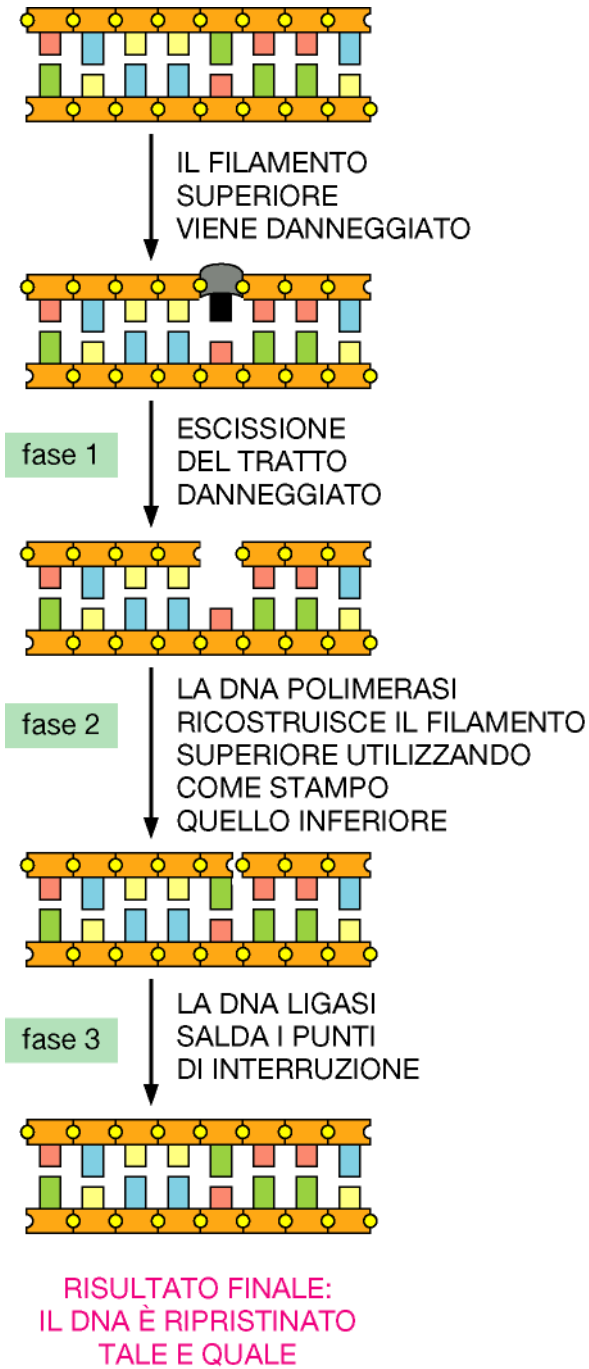



Alberts et al., L'ESSENZIALE DI BIOLOGIA MOLECOLARE DELLA CELLULA, Zanichelli editore S.p.A. Copyright © 2005




(B)

Alberts et al., L'ESSENZIALE DI BIOLOGIA MOLECOLARE DELLA CELLULA, Zanichelli editore S.p.A. Copyright © 2005

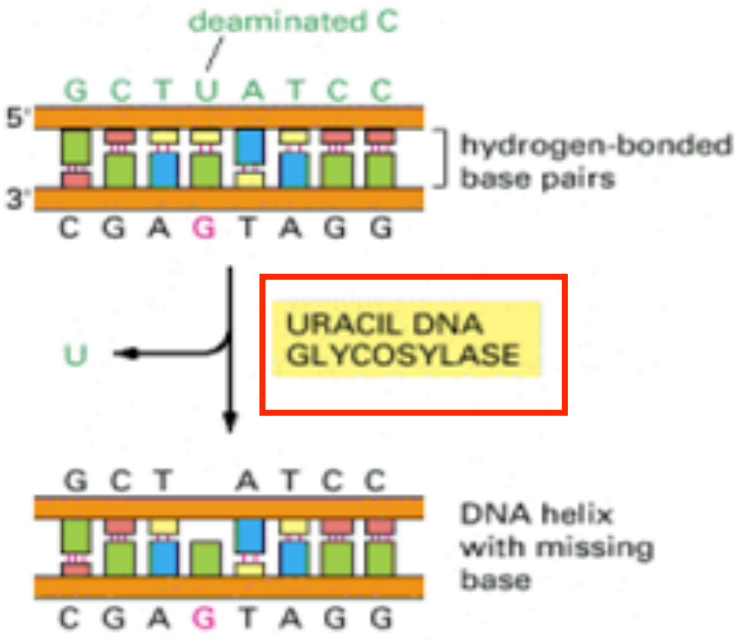


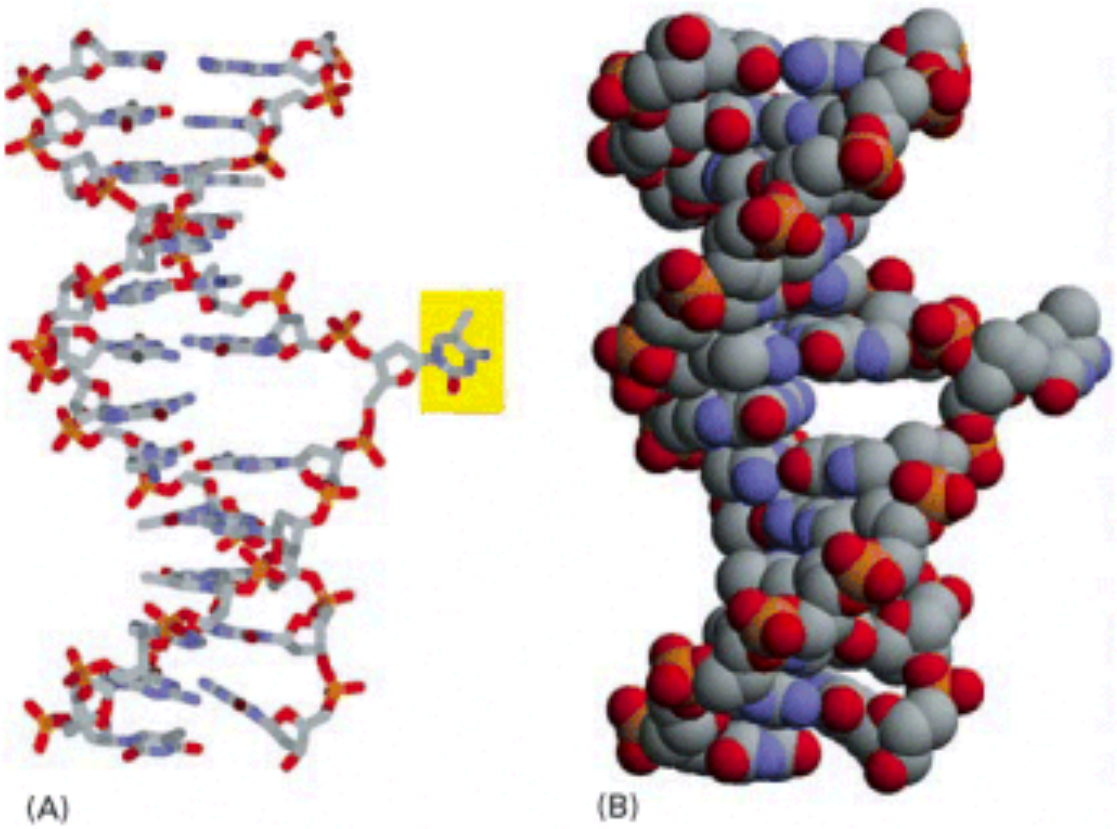

Alberts et al., L'ESSENZIALE DI BIOLOGIA MOLECOLARE DELLA CELLULA, Zanichelli editore S.p.A. Copyright © 2005

**Due vie principali di riparazione del DNA**

***1. Riparazione per escissione delle basi.***

Una **DNA glicosilasi** specifica catalizza la rimozione idrolitica del nucleotide alterato.






**Il riconoscimento di un nucleotide insolito nel DNA mediante giramento delle basi**.

La famiglia delle **DNA glicosilasi** riconosce basi specifiche nella conformazione mostrata. Ciascuno di questi enzimi taglia il legame glicosilico che connette una particolare base riconosciuta (in giallo) all'ossatura di zuccheri, rimuovendola dal DNA.

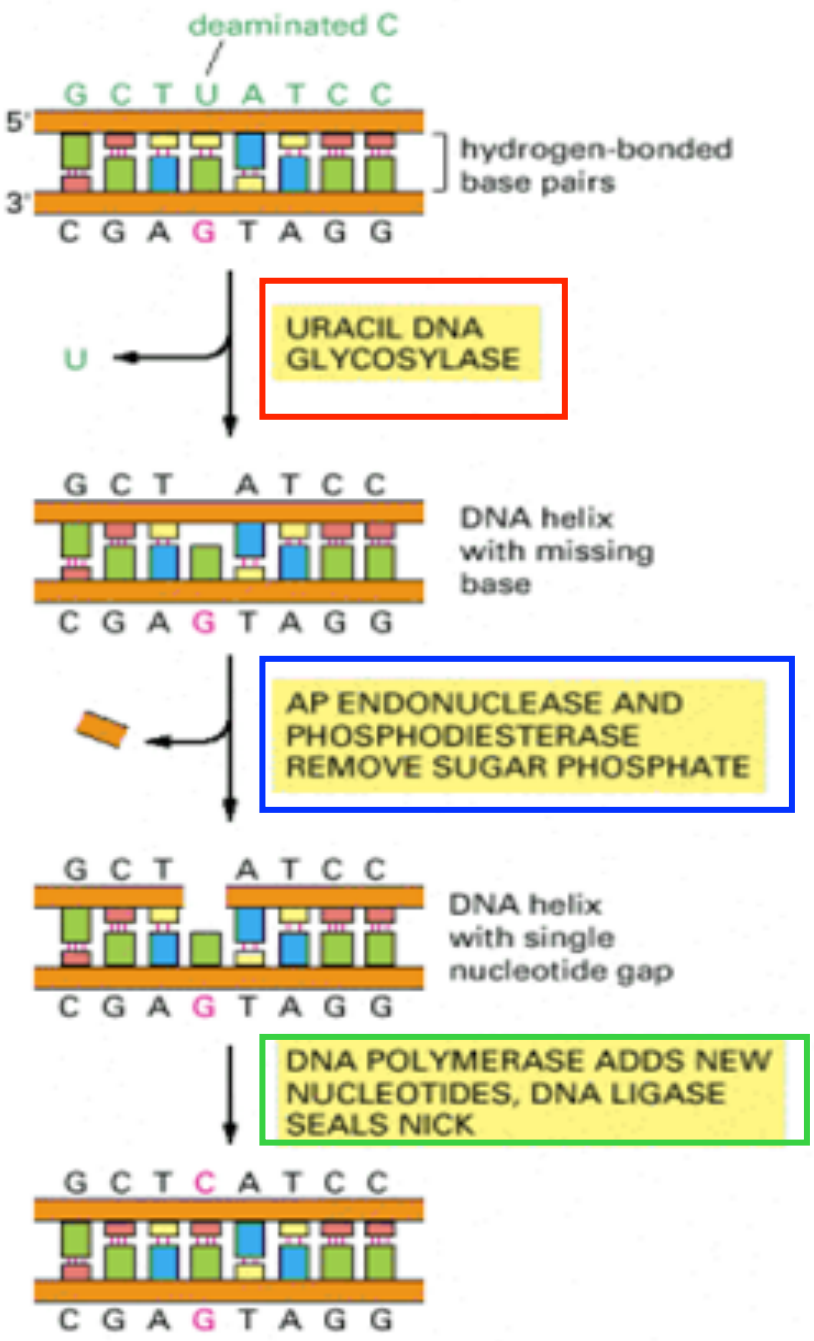
**Due vie principali di riparazione del DNA**

***1. Riparazione per escissione delle basi.***

Una **DNA glicosilasi** specifica catalizza la rimozione idrolitica del nucleotide alterato.

Lo zucchero fosfato della base mancante viene rimosso dall'azione sequenziale dell' **endonucleasi AP** e della **fosfodiesterasi**.

L'intervallo di un singolo nucleotide è riempito dalla **DNA polimerasi** e dalla **DNA ligasi**.

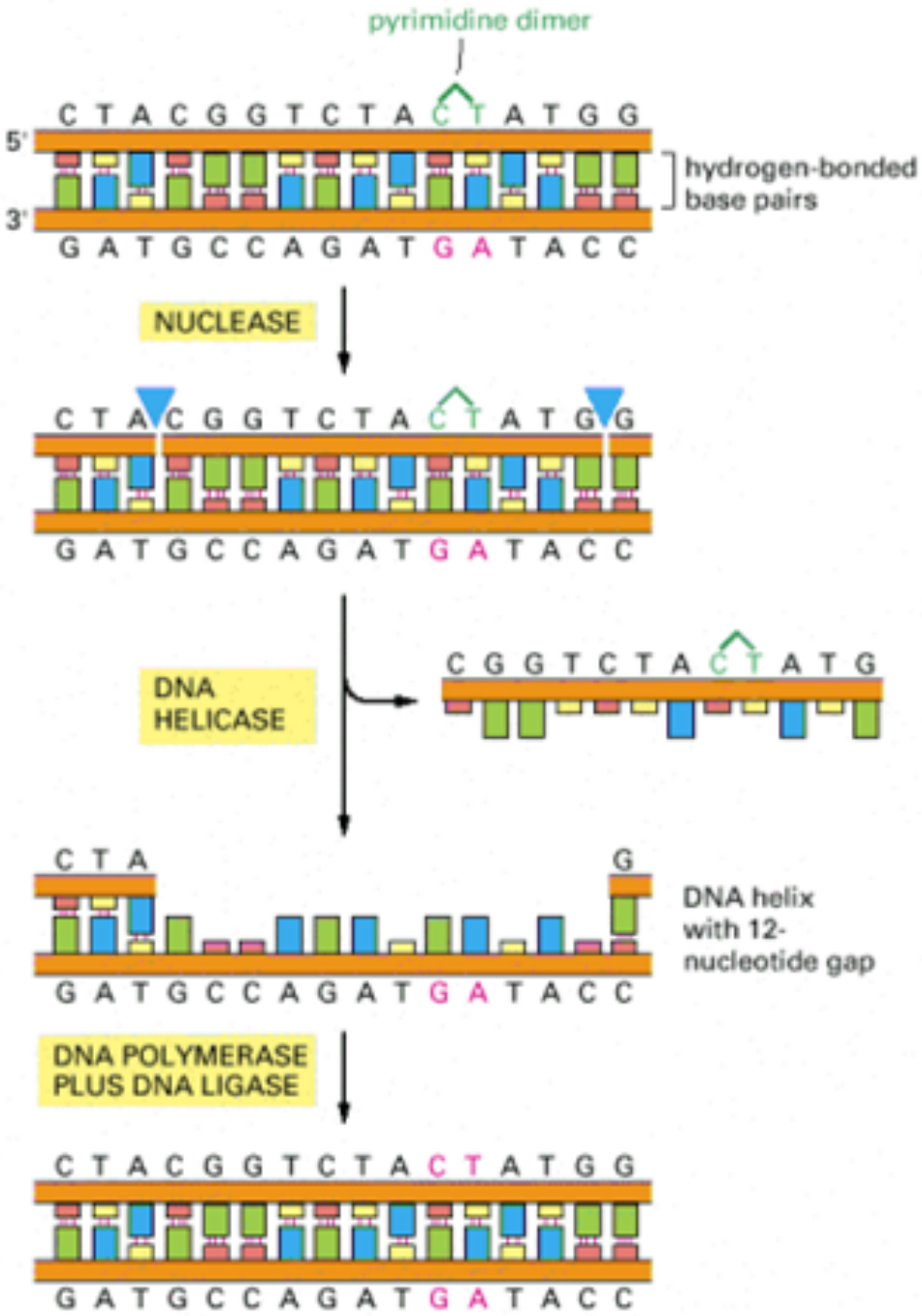


***2. Riparazione per escissione dei nucleotidi*.**

Dopo che un complesso multienzimatico ha riconosciuto una lesione voluminosa come un dimero di timina, viene fatto un taglio su ciascun lato della lesione, da parte di una **nucleasi di escissione**.

Una **DNA elicasi** associata rimuove l'intera porzione del filamento danneggiato.

**DNA polimerasi** e **DNA ligasi**



```
BALENA   GTGTGGTCTCGTGATCAAAGGCGAAAGGTGGCTCTAGAGAATCCC
         ||||||||||| ||||| ||||| ||| ||||||||||||||||||
UOMO     GTGTGGTCTCGCGATCAGAGGCGCAAGATGGCTCTAGAGAATCCC
```

I meccanismi che duplicano e riparano il DNA sono così accurati che, anche nei tratti non soggetti a selezione, il messaggio ereditario si conserva fedele per decine di milioni di anni.

Alberts et al., L'ESSENZIALE DI BIOLOGIA MOLECOLARE DELLA CELLULA, Zanichelli editore S.p.A. Copyright © 2005

**Le rotture a doppio filamento sono riparate in modo efficiente**

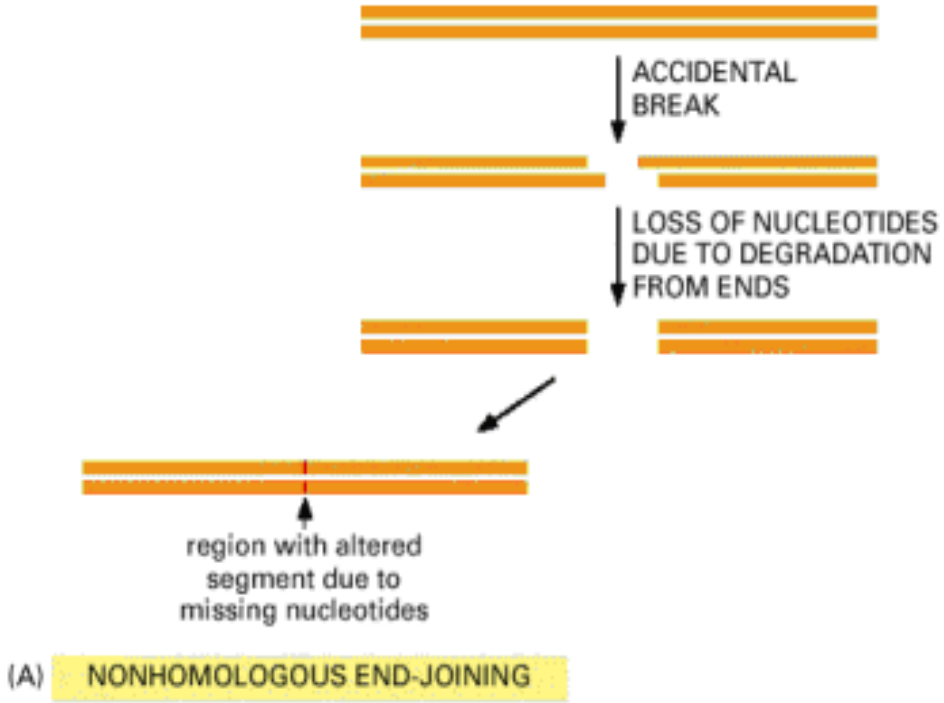
Un tipo di danno al DNA particolarmente pericoloso si verifica quando sono rotti **entrambi i filamenti** della doppia elica, senza che vi sia un filamento stampo intatto per permettere una riparazione accurata.

Le rotture di questo tipo sono causate da radiazioni ionizzanti, agenti ossidanti, errori di replicazione…

Se queste lesioni non venissero riparate, porterebbero rapidamente alla demolizione dei cromosomi in frammenti più piccoli e alla perdita di geni quando la cellula si divide.

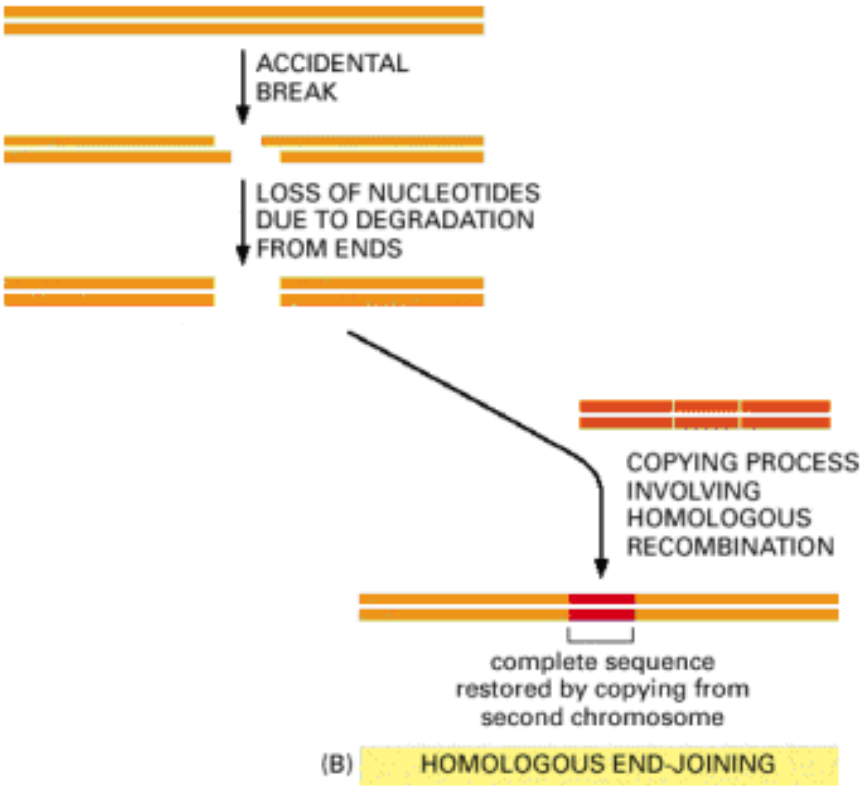
Due modi diversi di riparare rotture a doppio filamento:

1) Unione non omologa delle estremità
2) Ricombinazione omologa



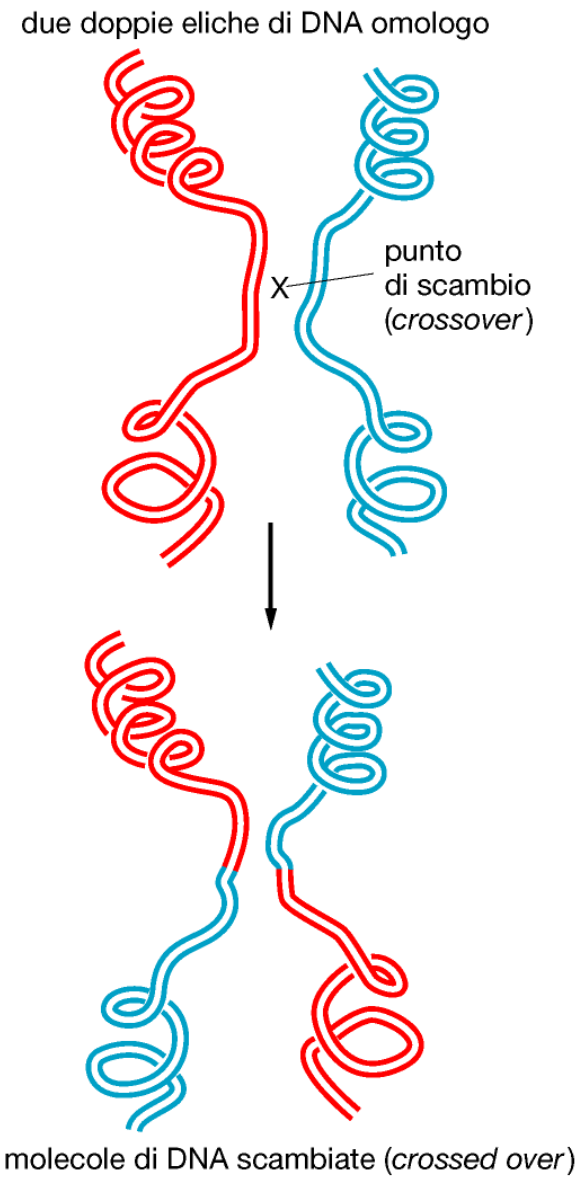

L'**unione non omologa delle estremità** altera la sequenza originale del DNA quando ripara cromosomi rotti. Queste alterazioni possono essere delezioni o brevi inserzioni.

Una soluzione "veloce e malfatta" comune nelle cellule somatiche.
In un essere umano di 70 anni una tipica cellula somatica contiene circa 2000 di queste "cicatrici"




La riparazione delle rotture a doppio filamento mediante ricombinazione omologa è più difficile da eseguire, ma questo tipo di riparazione ripristina la sequenza originale di DNA.

E' usata durante la replicazione del DNA e subito dopo (nelle fasi S e G2) quando i cromatidi fratelli sono disponibili per servire da stampo.



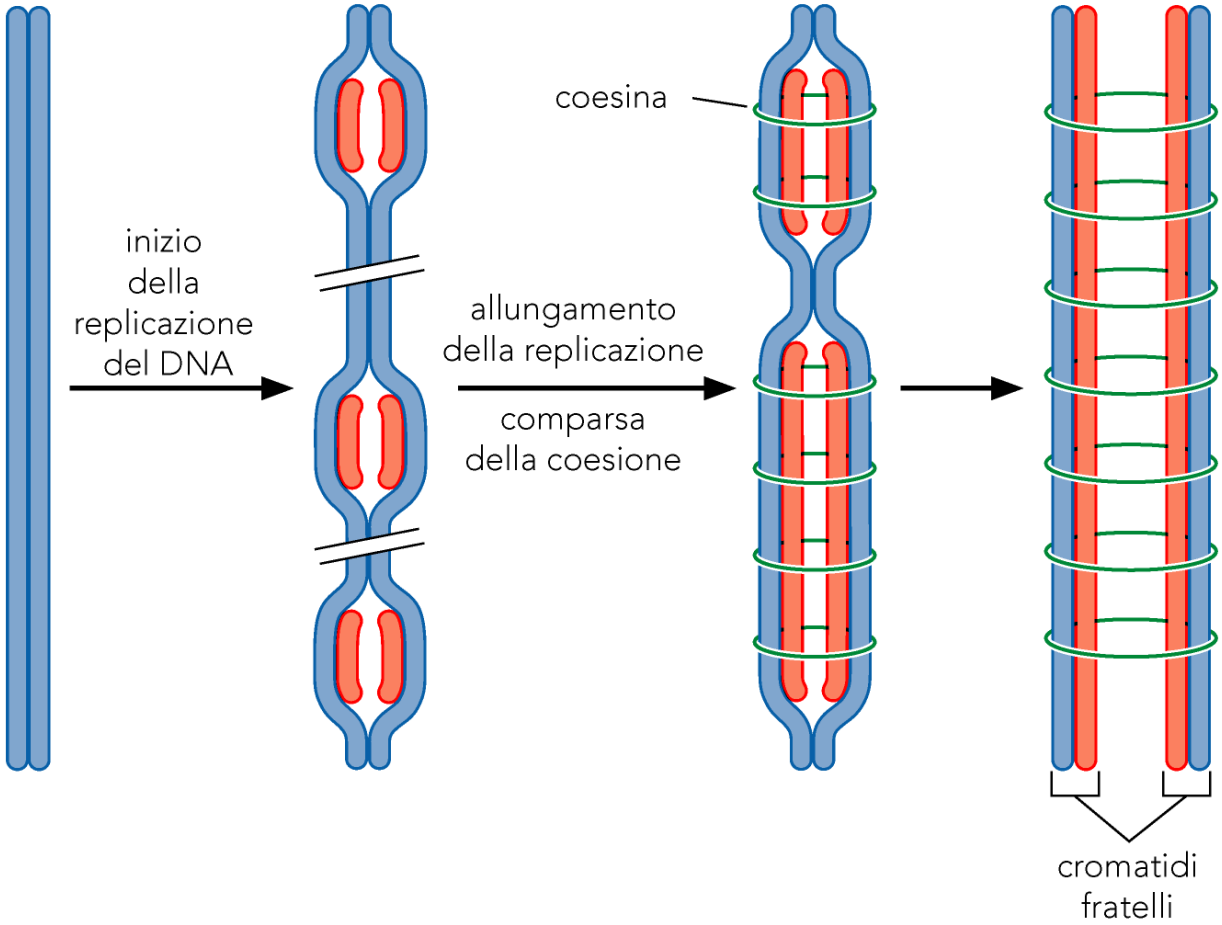

La **ricombinazione omologa** consiste in uno scambio di informazione genetica ad alta precisione

Avviene tra molecole di DNA con sequenza nucleotidica similare

Non è necessario che le sequenze siano identiche

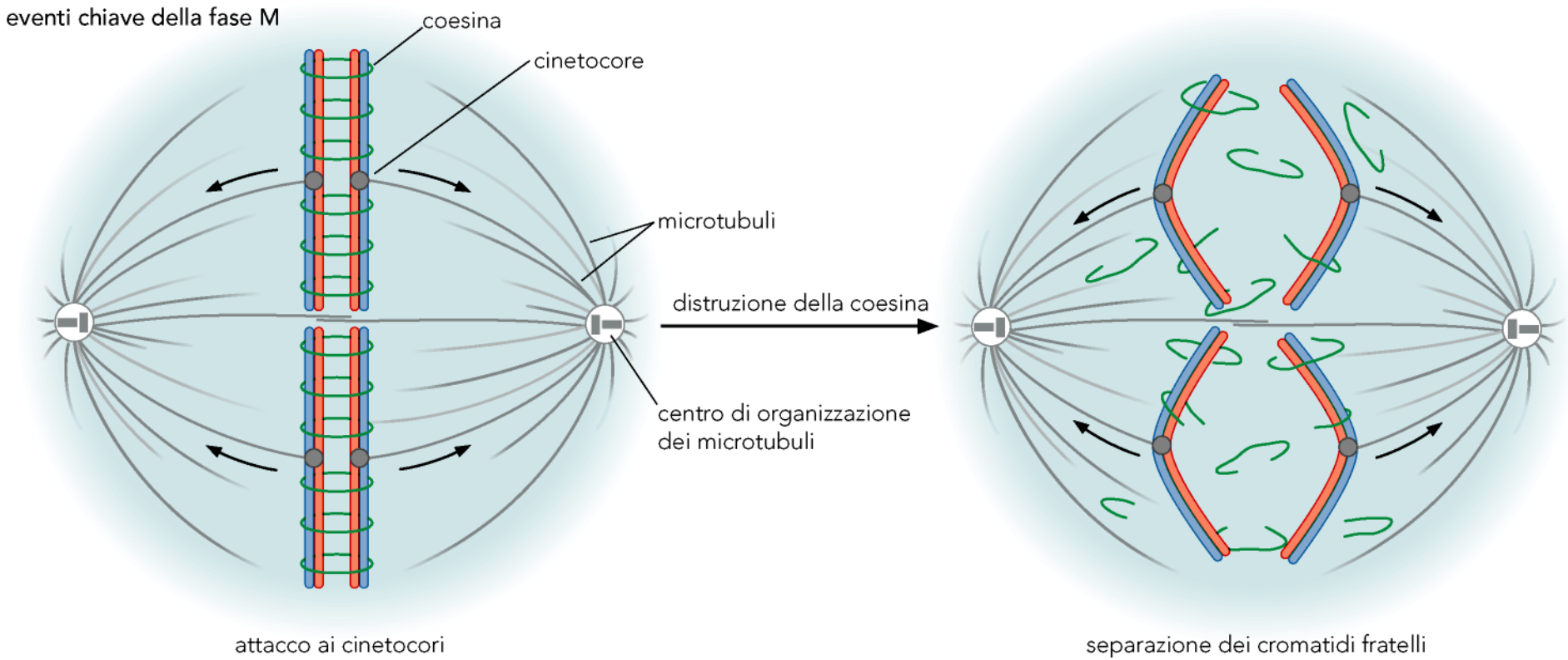
Alberts et al., L'ESSENZIALE DI BIOLOGIA MOLECOLARE DELLA CELLULA, Zanichelli editore S.p.A. Copyright © 2005

eventi chiave della fase S

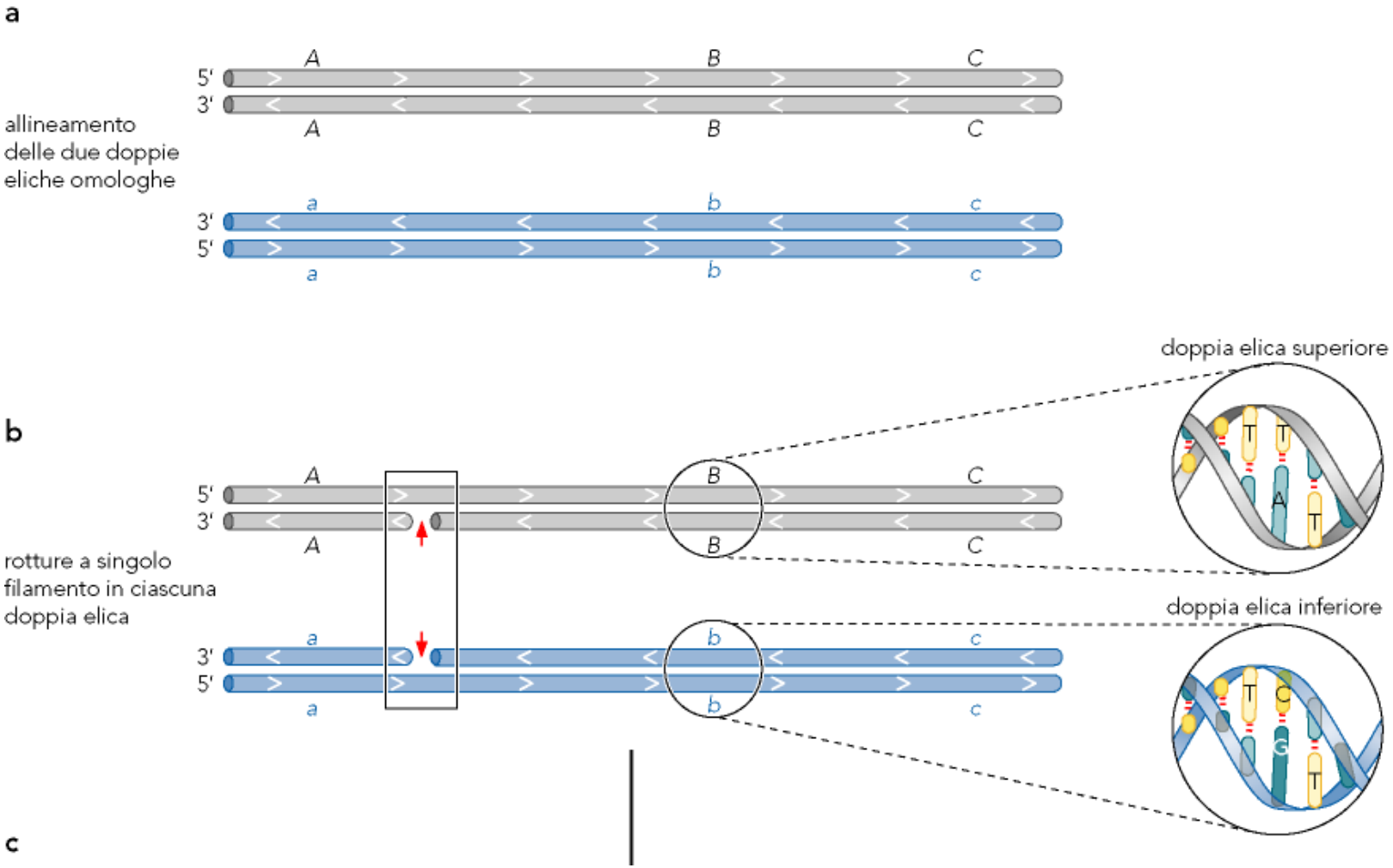



Watson et al., BIOLOGIA MOLECOLARE DEL GENE, Zanichelli editore S.p.A. Copyright © 2005

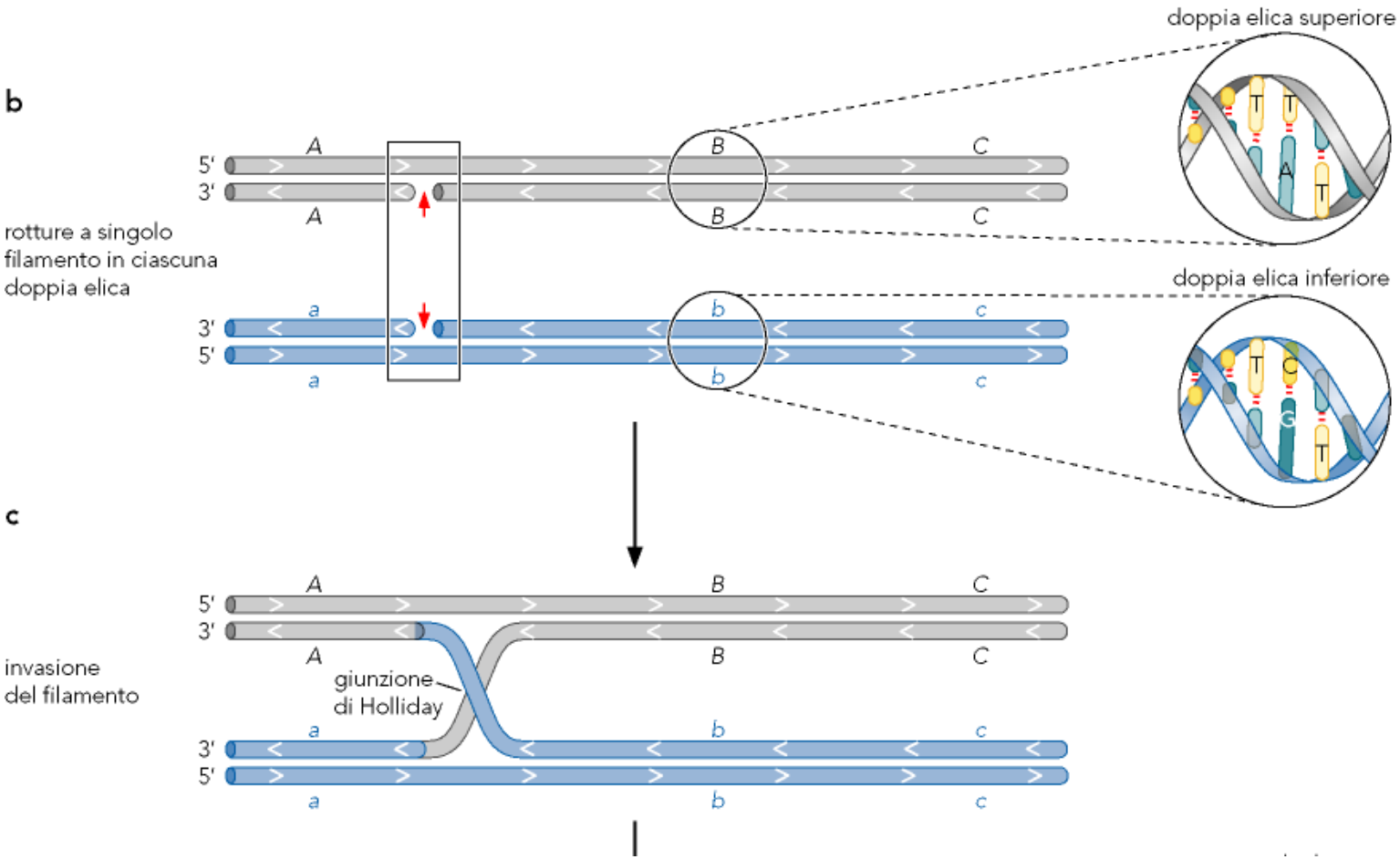
# Mitosi



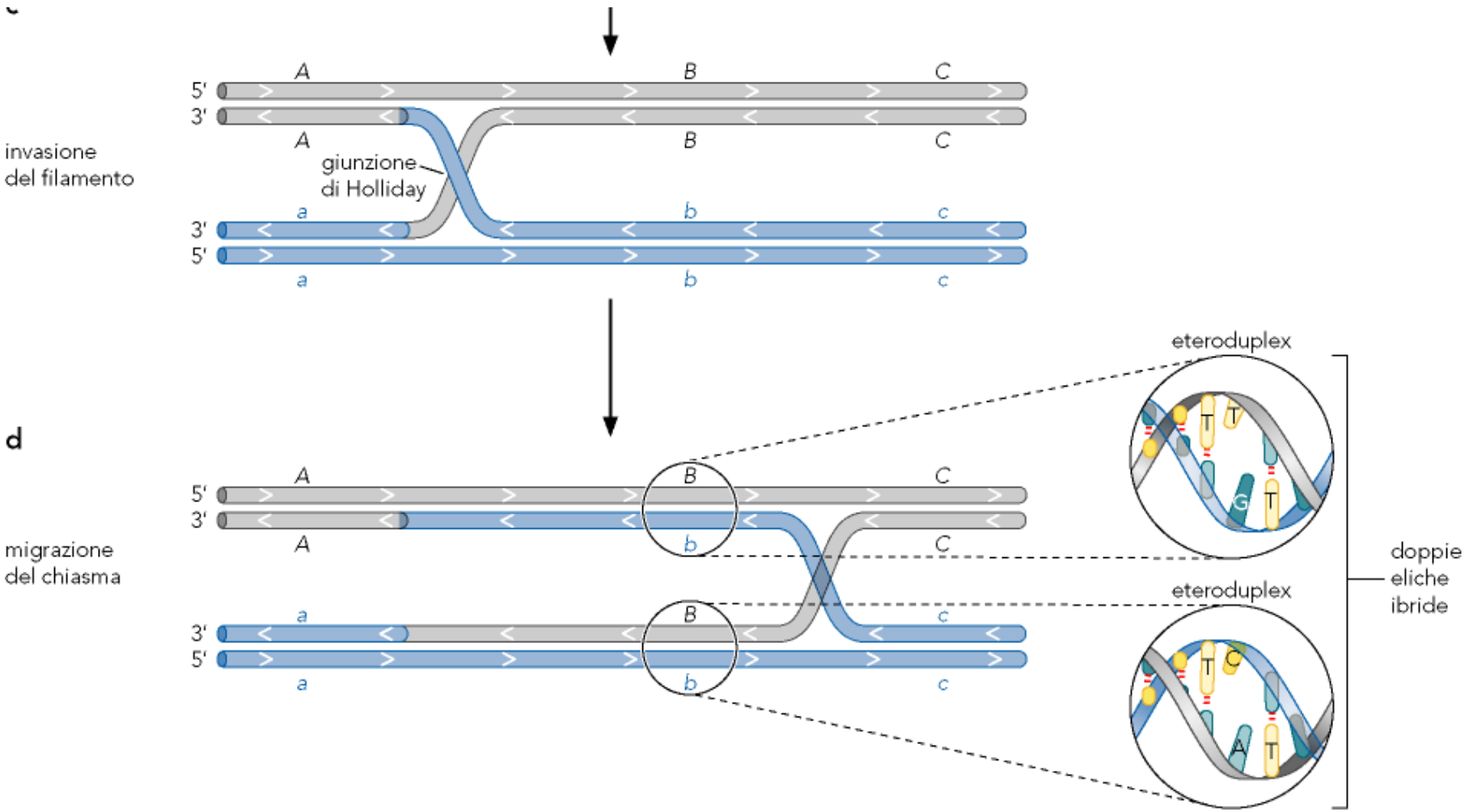

Watson et al., BIOLOGIA MOLECOLARE DEL GENE, Zanichelli editore S.p.A. Copyright © 2005




Watson et al., BIOLOGIA MOLECOLARE DEL GENE, Zanichelli editore S.p.A. Copyright © 2005

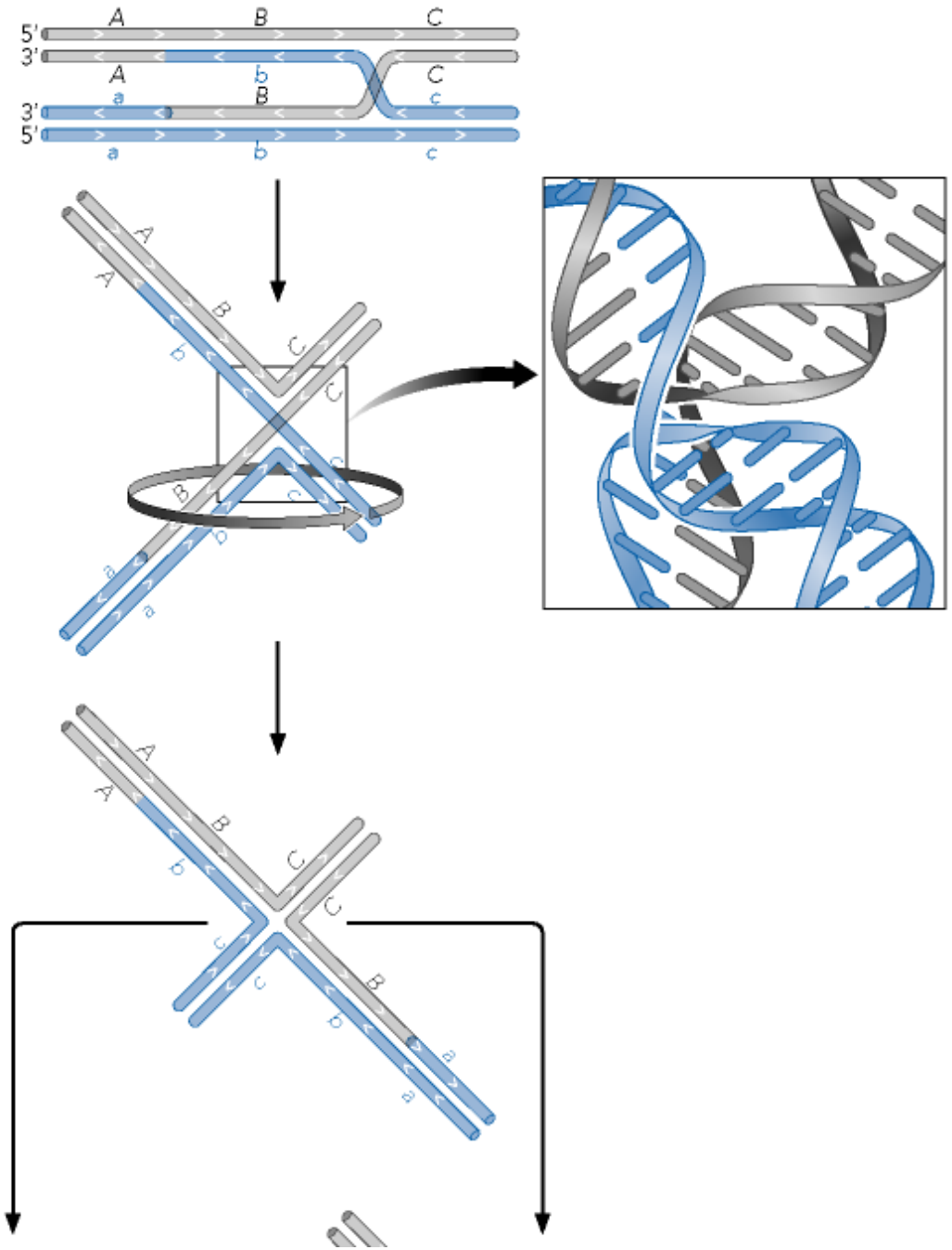


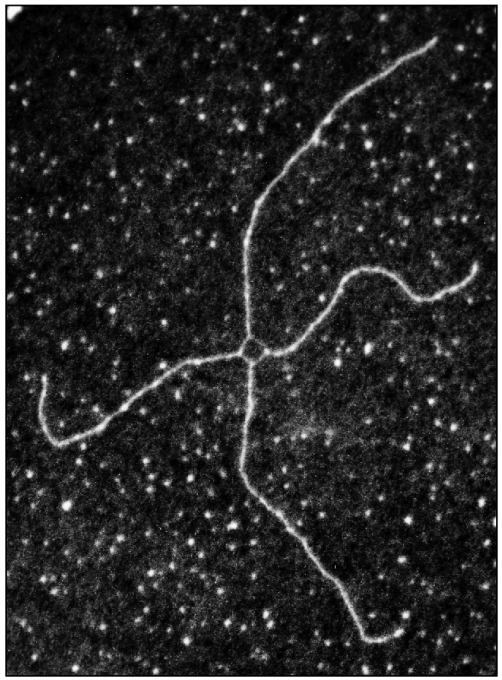

Watson et al., BIOLOGIA MOLECOLARE DEL GENE, Zanichelli editore S.p.A. Copyright © 2005



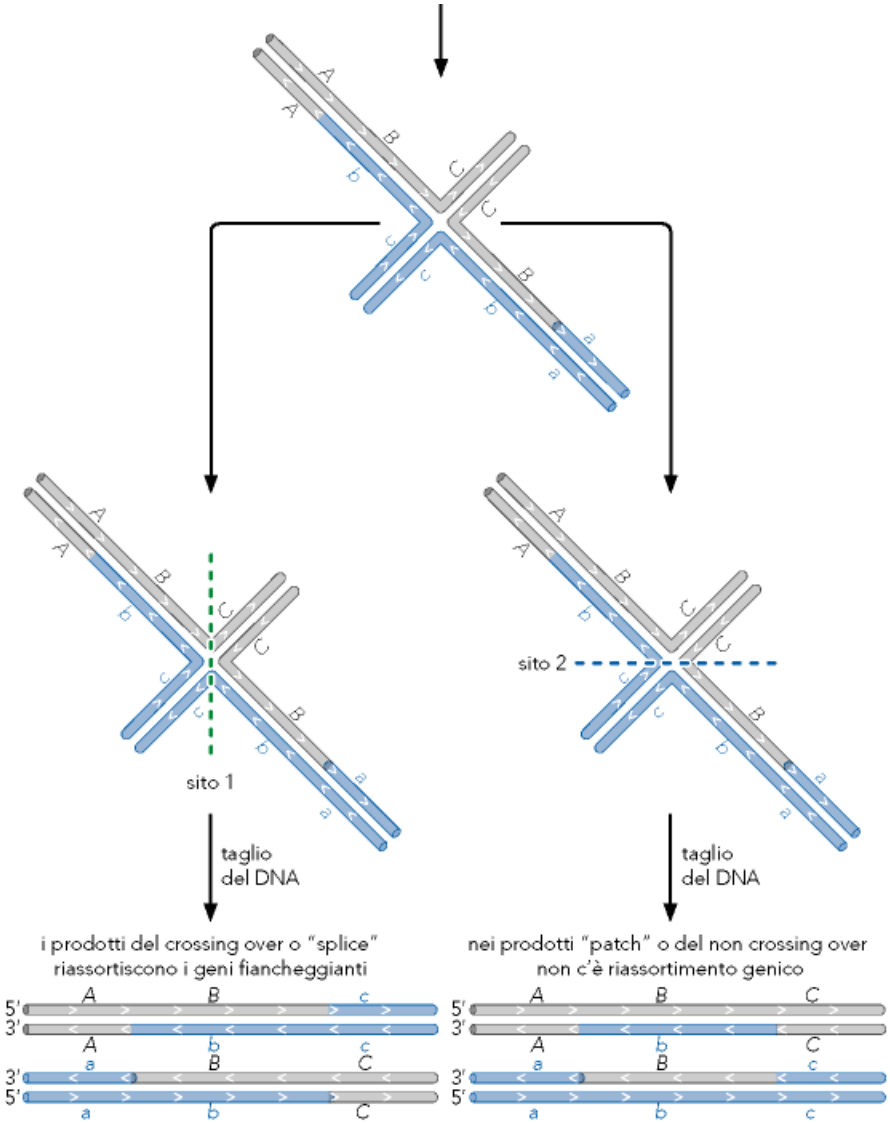

Watson et al., BIOLOGIA MOLECOLARE DEL GENE, Zanichelli editore S.p.A. Copyright © 2005

# Giunzione di Holliday

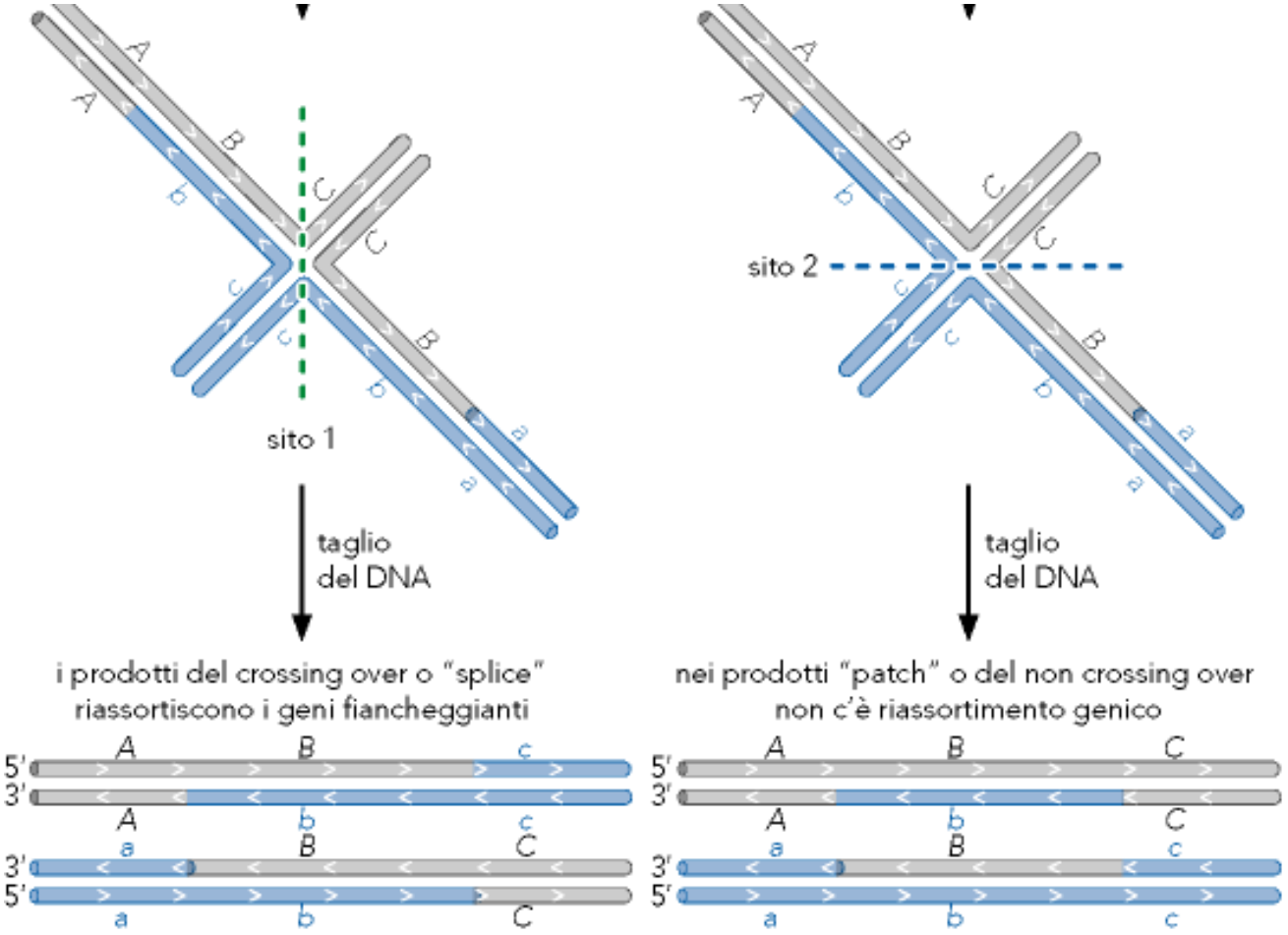


Watson et al., BIOLOGIA MOLECOLARE DEL GENE, Zanichelli editore S.p.A. Copyright © 2005

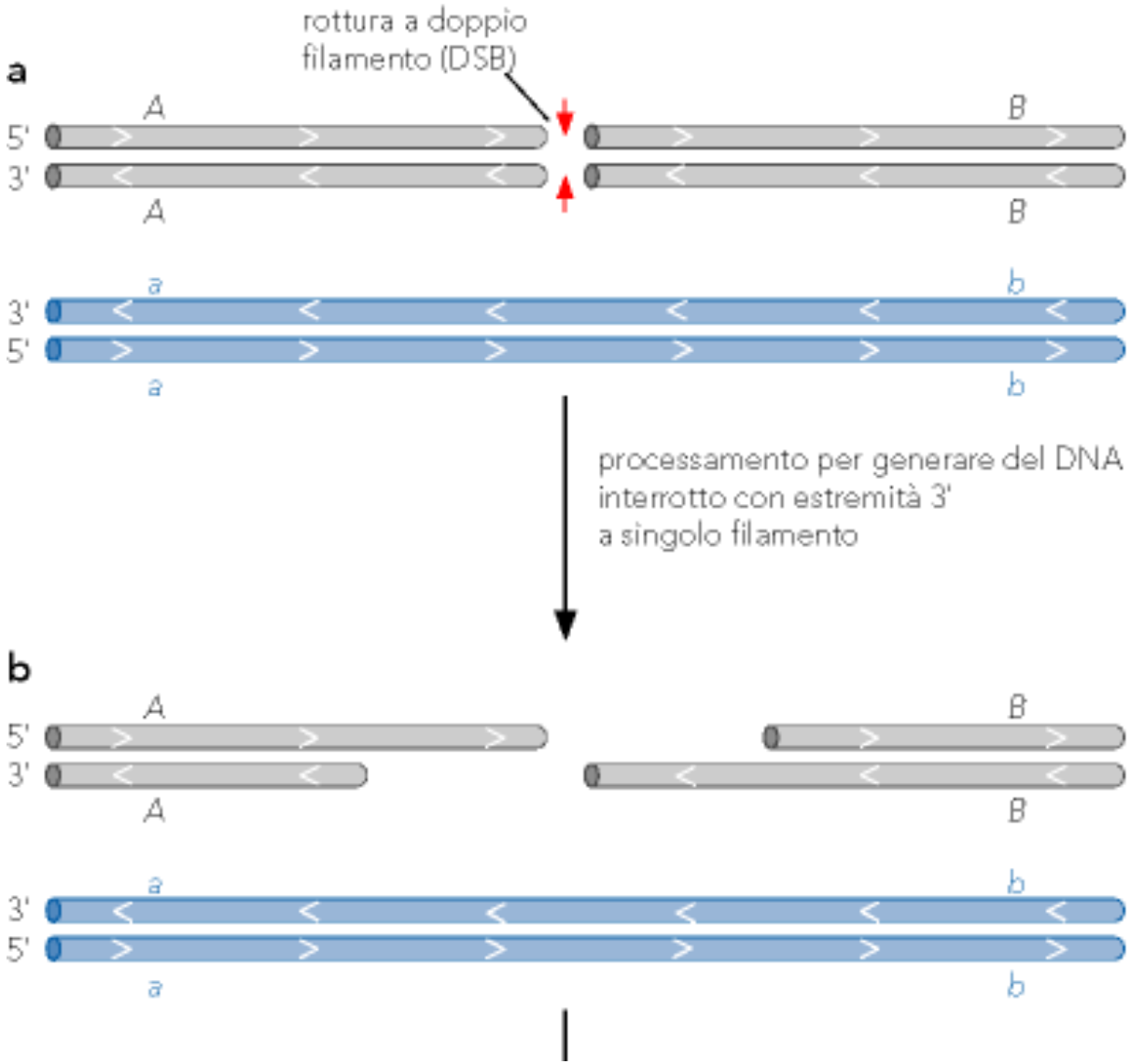



Watson et al., BIOLOGIA MOLECOLARE DEL GENE, Zanichelli editore S.p.A. Copyright © 2005

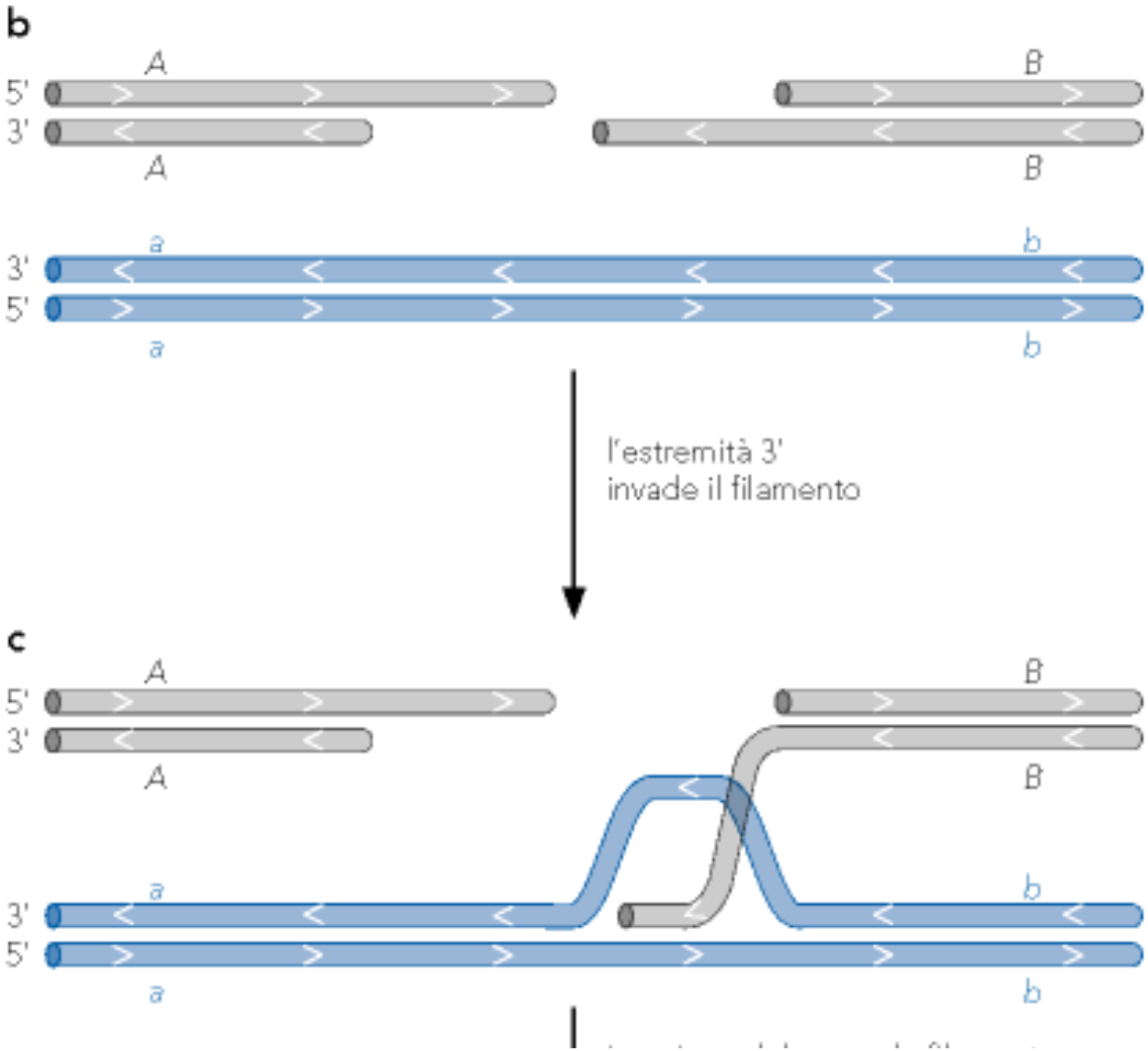



Watson et al., BIOLOGIA MOLECOLARE DEL GENE, Zanichelli editore S.p.A. Copyright © 2005

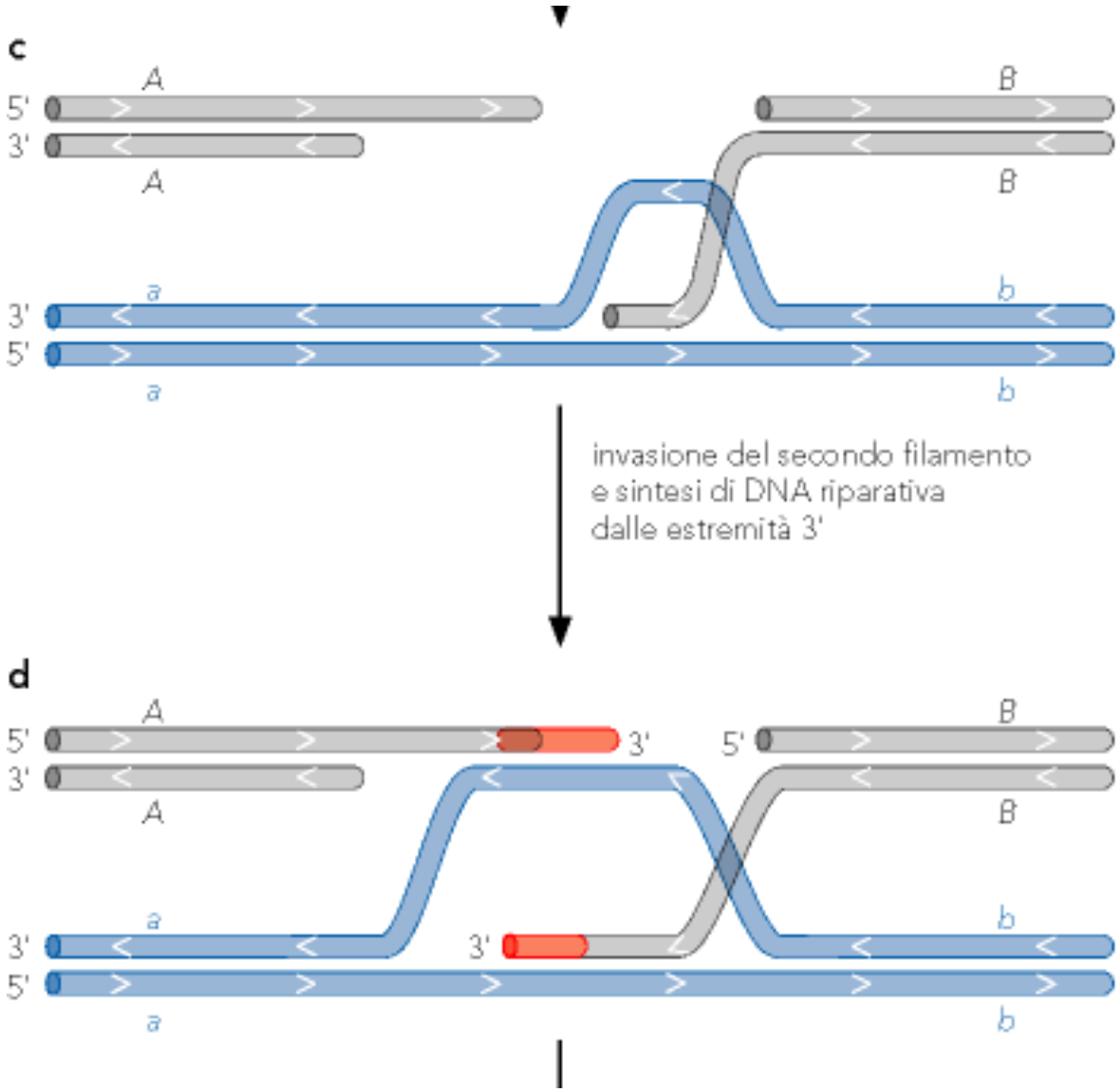
# Il modello della riparazione dei DSB per la ricombinazione omologa



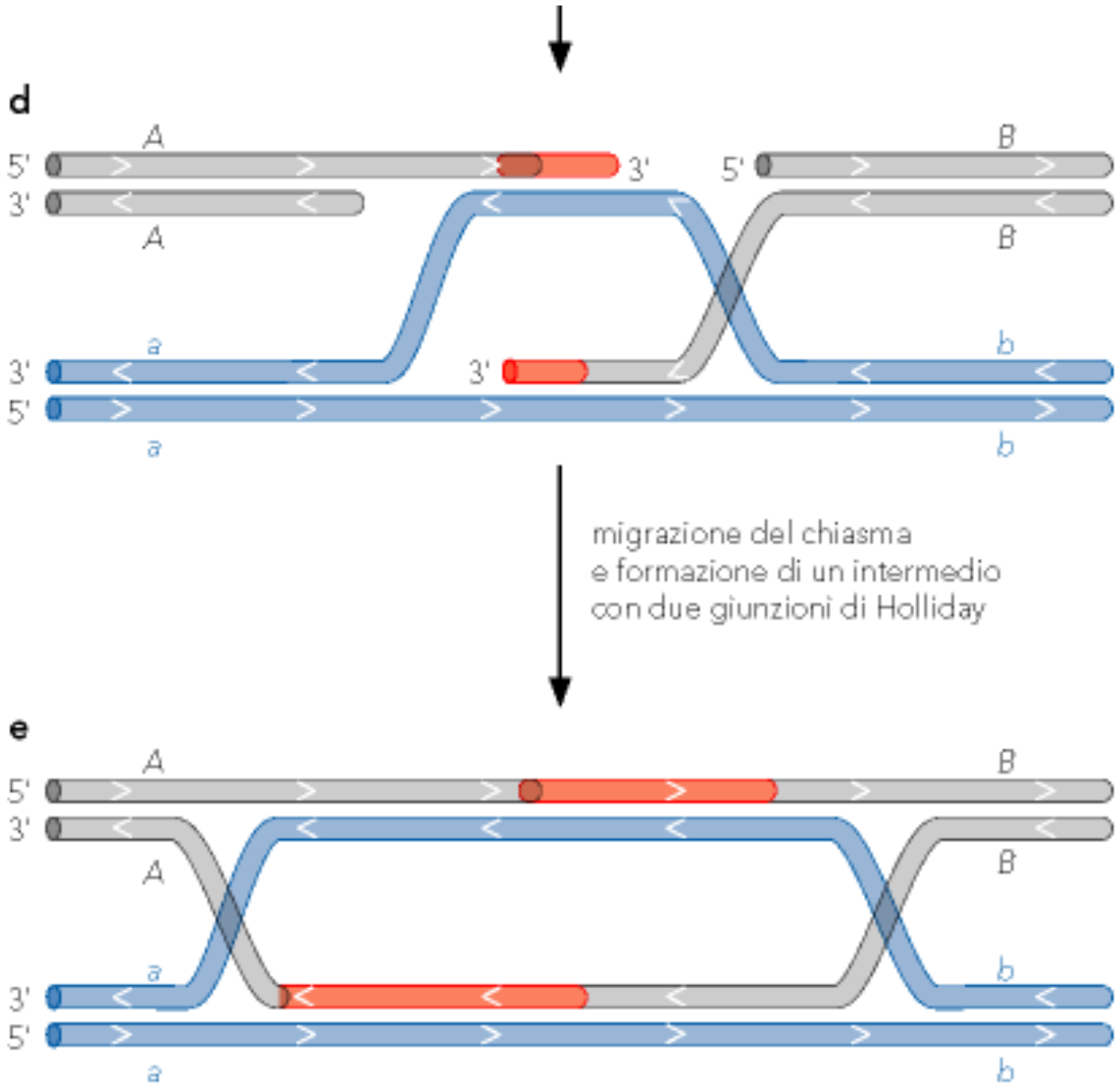

Watson et al., BIOLOGIA MOLECOLARE DEL GENE, Zanichelli editore S.p.A. Copyright © 2005




Watson et al., BIOLOGIA MOLECOLARE DEL GENE, Zanichelli editore S.p.A. Copyright © 2005

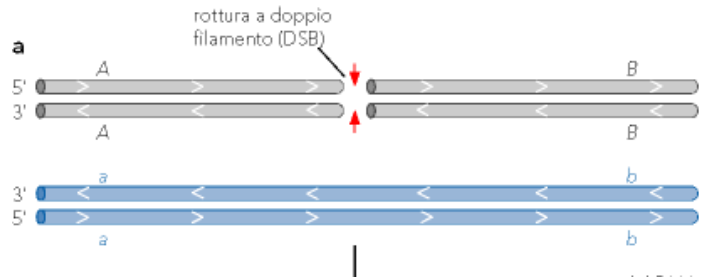


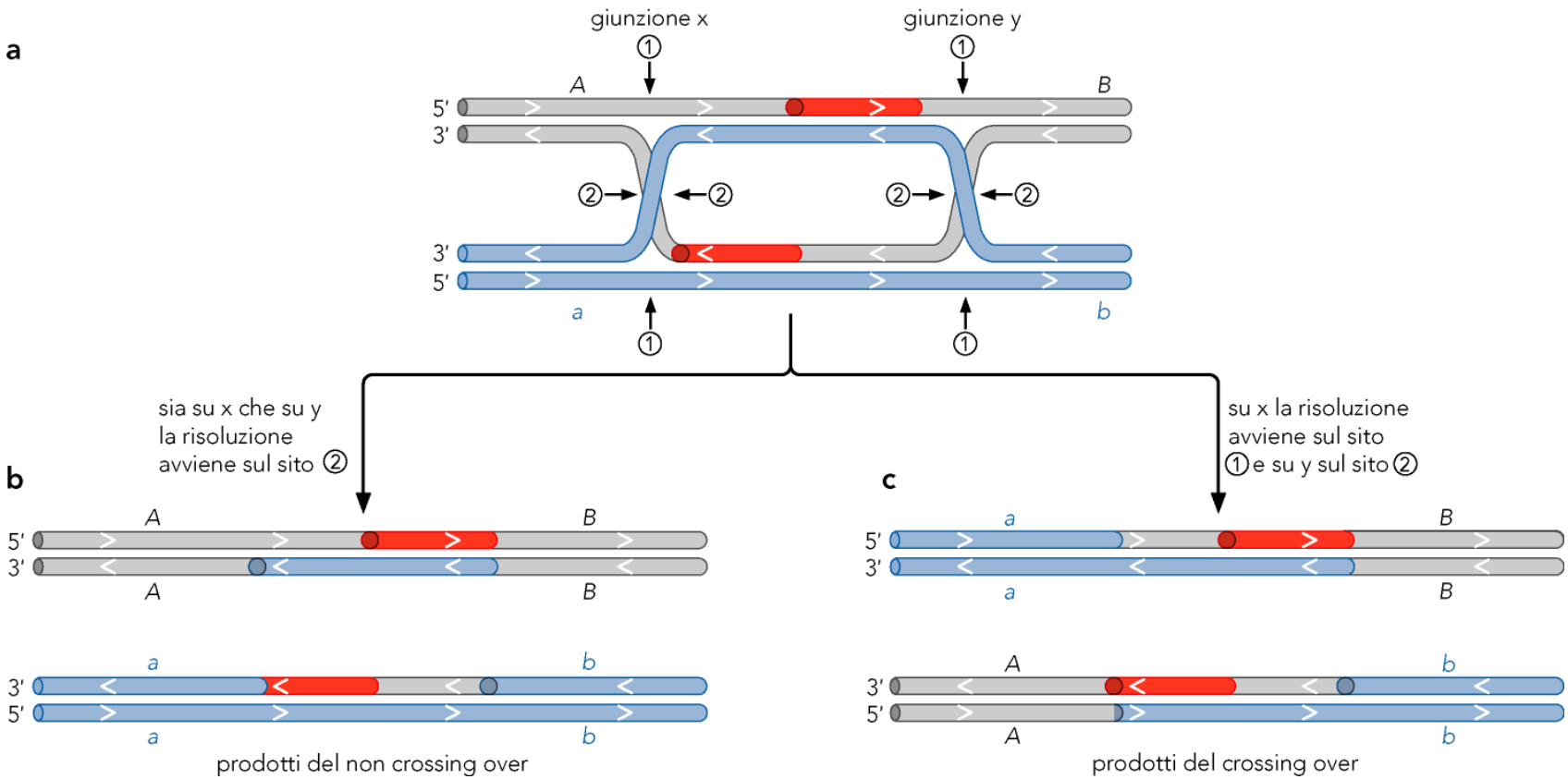

Watson et al., BIOLOGIA MOLECOLARE DEL GENE, Zanichelli editore S.p.A. Copyright © 2005




Watson et al., BIOLOGIA MOLECOLARE DEL GENE, Zanichelli editore S.p.A. Copyright © 2005

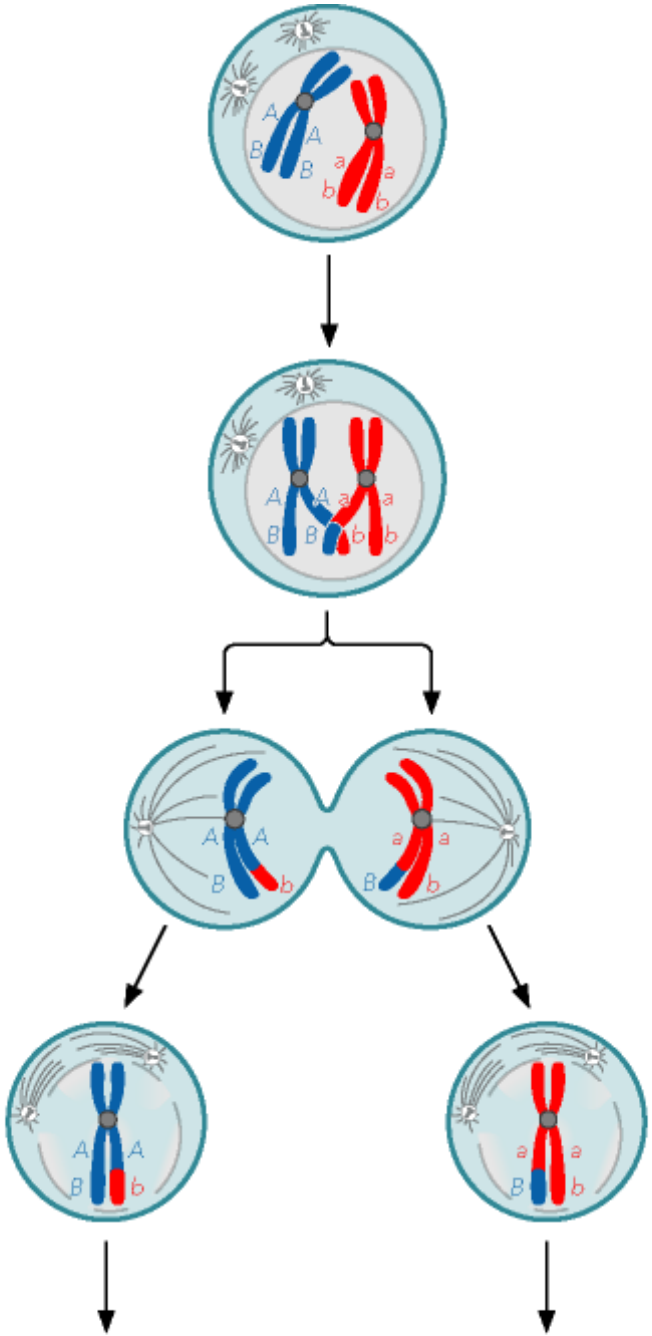
# L'intermedio del sistema di riparazione dei DSB può essere risolto in due modi

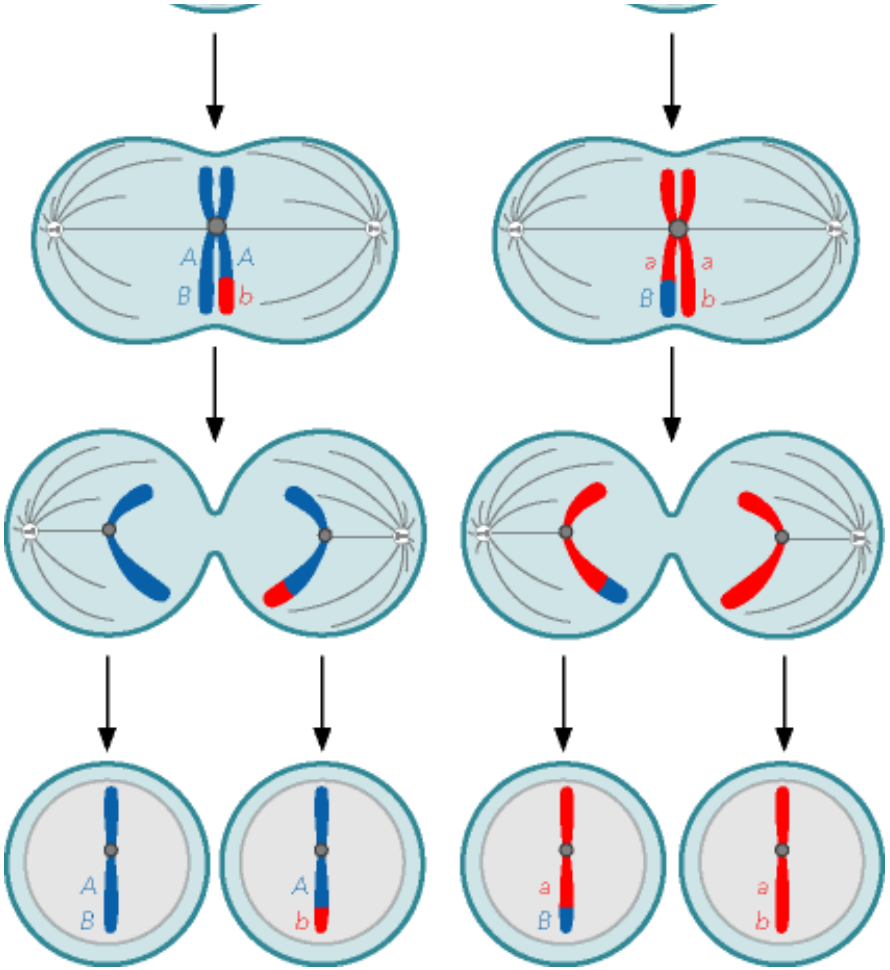


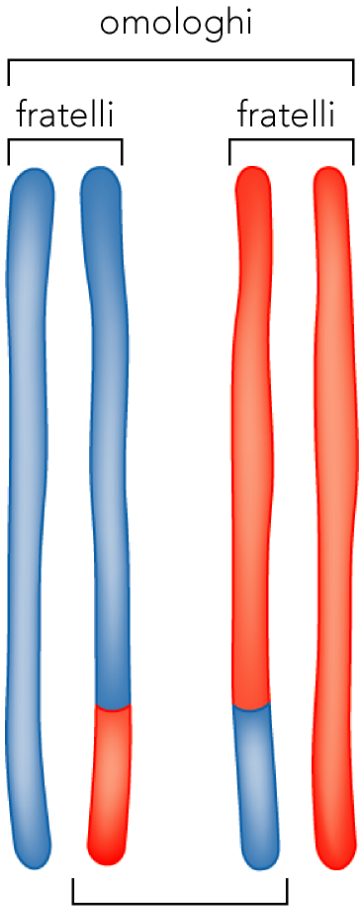

Watson et al., BIOLOGIA MOLECOLARE DEL GENE, Zanichelli editore S.p.A. Copyright © 2005

# Dinamica del DNA durante la meiosi



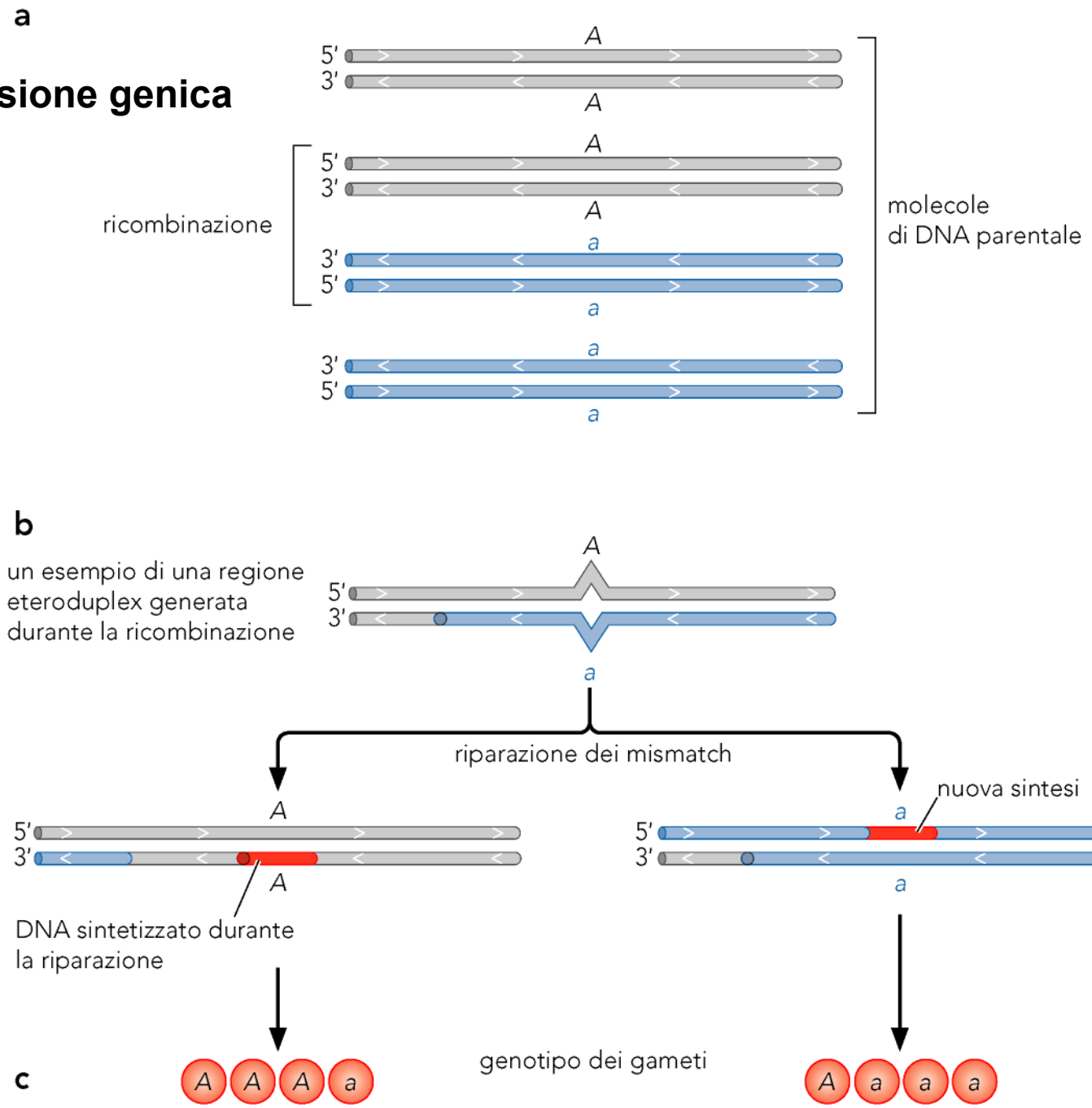

Watson et al., BIOLOGIA MOLECOLARE DEL GENE, Zanichelli editore S.p.A. Copyright © 2005




# Ricombinazione meiotica tra cromatidi omologhi

Watson et al., BIOLOGIA MOLECOLARE DEL GENE, Zanichelli editore S.p.A. Copyright © 2005

# Conversione genica




Watson et al., BIOLOGIA MOLECOLARE DEL GENE, Zanichelli editore S.p.A. Copyright © 2005