



Università degli Studi di Pavia

Dipartimento di Genetica e Microbiologia

Laboratorio di Biologia Molecolare e Cellulare

Responsabile Prof. Elena Giulotto

Solomon G. Nergadze

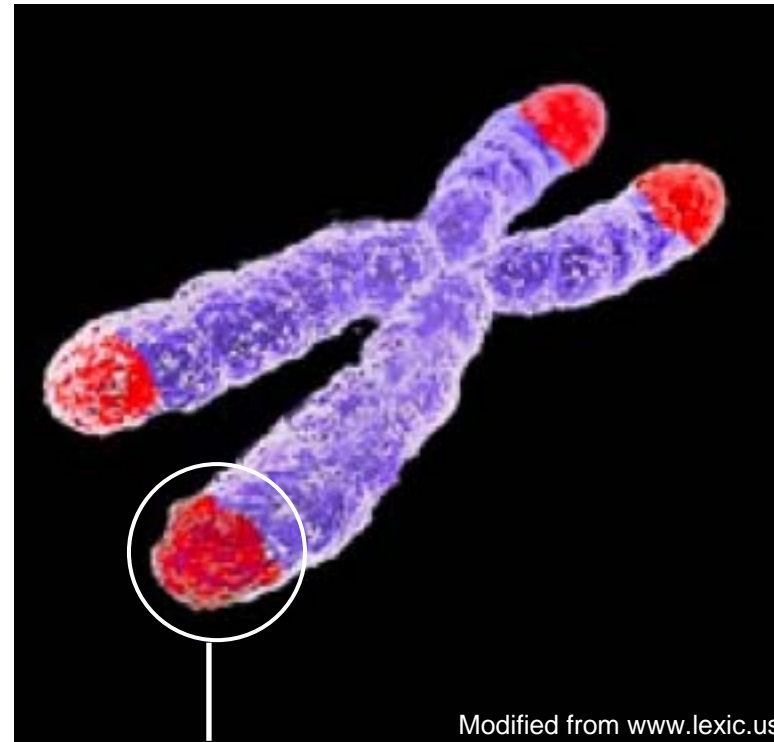
“Instabilità del genoma nella tumorigenesi e nell'evoluzione”

26 Giugno 2009
Pavia

Trascrizione di RNA umano contenente ripetizioni telomeriche (TERRA)

I telomeri

strutture nucleoproteiche posizionate alla fine dei cromosomi lineari degli eucarioti, proteggono le estremità dei cromosomi dalla riparazione del DNA e dalla degradazione



DNA telomerico umano

estremità 3' protrudente ricca in G

5'---ctcatgtgc**TTAGGGTTAGGGTTAGGG**...}}...**TTAGGGTTAGGGTTAGGG**...}}...**TTAGGGTTAGGG**-3'
3'---gagtacacg**AATCCCAATCCCAATCCC**...}}...**AATCCCAATCCC**-5'

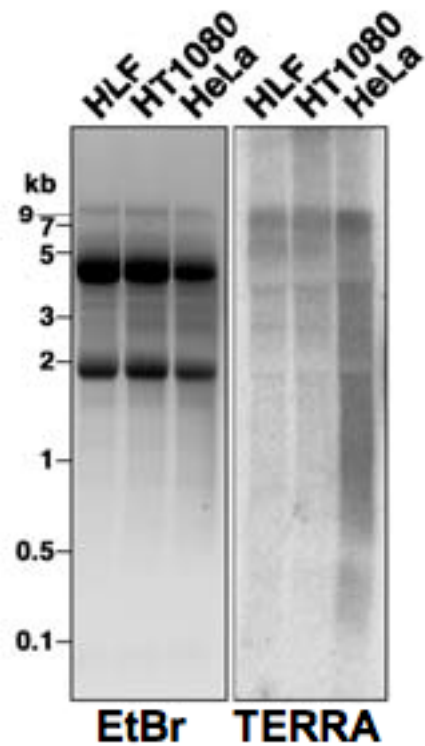
Azzalin CM, Reichenbach P, Khoriantuli L, Giulotto E, Lingner J. (2007)
Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at
mammalian chromosome ends. **Science**. 318:798-801

Epub Oct. 4, 2007

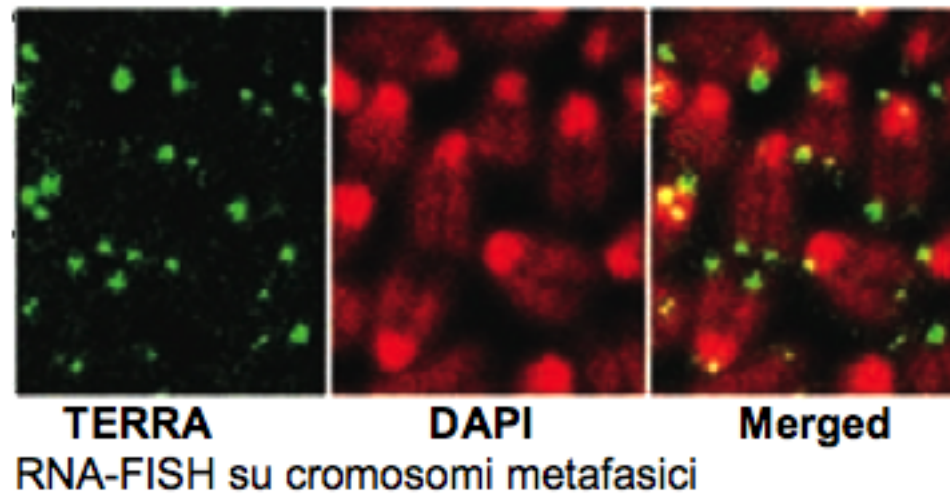
I telomeri dei mammiferi sono trascritti in RNA contenente ripetizioni
telomeriche (TERRA)

Le molecole di TERRA sono trascritte da differenti loci subtelomerici verso
le estremità dei cromosomi

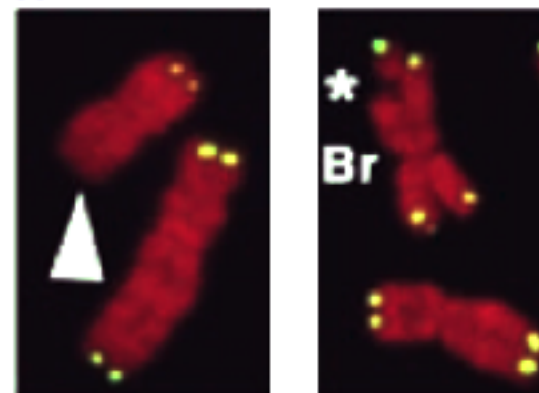
Le molecole di TERRA hanno lunghezza eterogenea e sono localizzate ai telomeri



Esperimento di northern blot con RNA nucleare estratto da fibroblasti primari umani telomerasi-negativi (HLF) e da linee cellulari immortali telomerasi-positive (HeLa e HT1080) eseguito usando sonde specifiche per ciascun filamento di DNA



L'aumento dell'associazione di TERRA con i telomeri induce instabilità genomica



La perdita delle proteine UPF1 o EST1A causa l'aumento di associazione di TERRA con i telomeri provocando accorciamento e instabilità dei telomeri

Telomeri



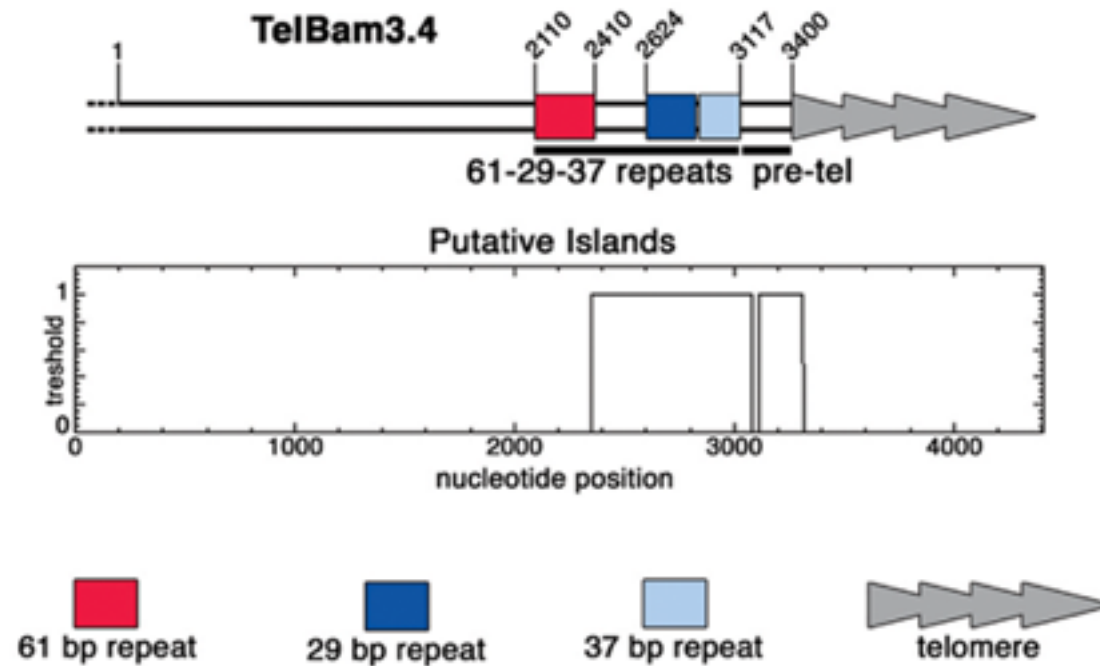
Trascrizione

TERRA

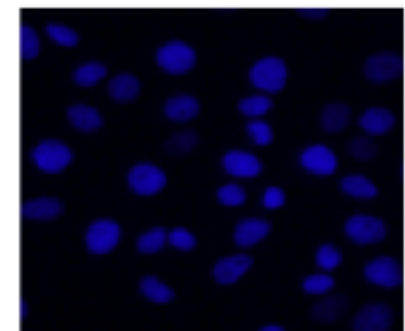
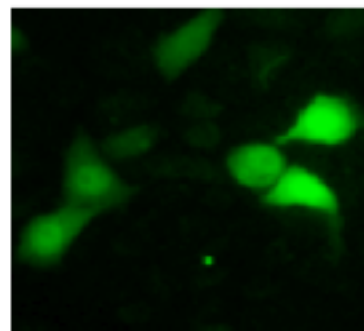
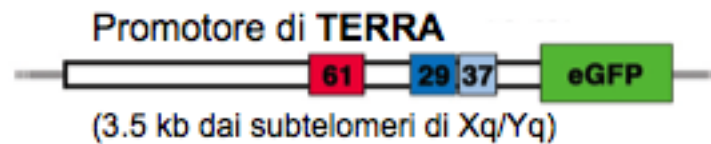
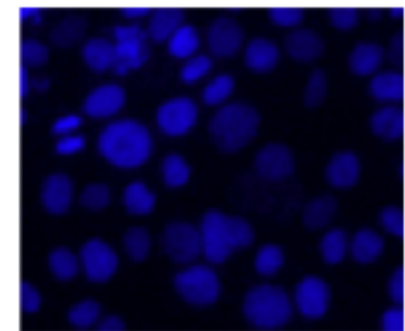
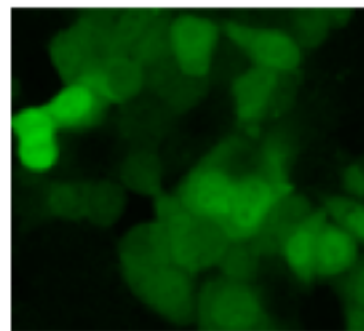
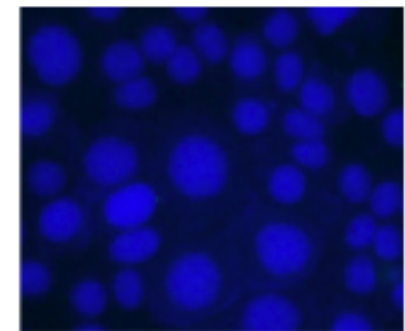
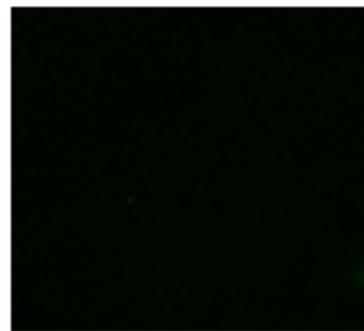
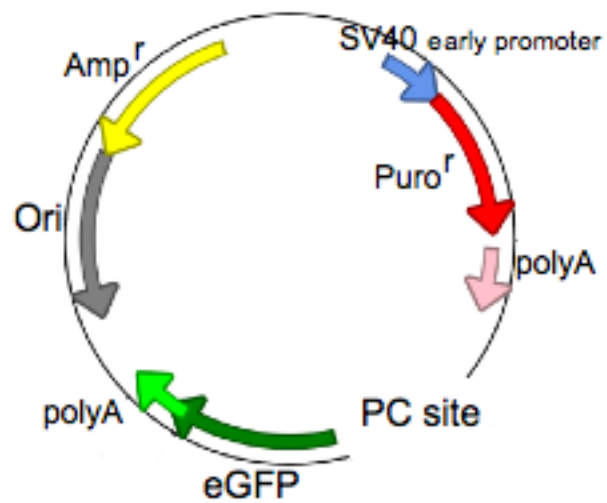
Dov'è il promotore responsabile della trascrizione di TERRA?

Promotore con isola CpG ai subtelomeri **TelBam3.4**

Contenuto in GC: 66-88%



Saggio funzionale del promotore



I telomeri dei mammiferi sono trascritti in molecole di RNA contenenti ripetizioni telomeriche (TERRA) eterogenee in lunghezza e localizzate ai telomeri;

L'aumento dell'associazione di TERRA con i telomeri porta a instabilità genomica;

Le isole CpG, condivise da molteplici estremità dei cromosomi umani (≥ 20), promuovono la trascrizione delle molecole di TERRA;

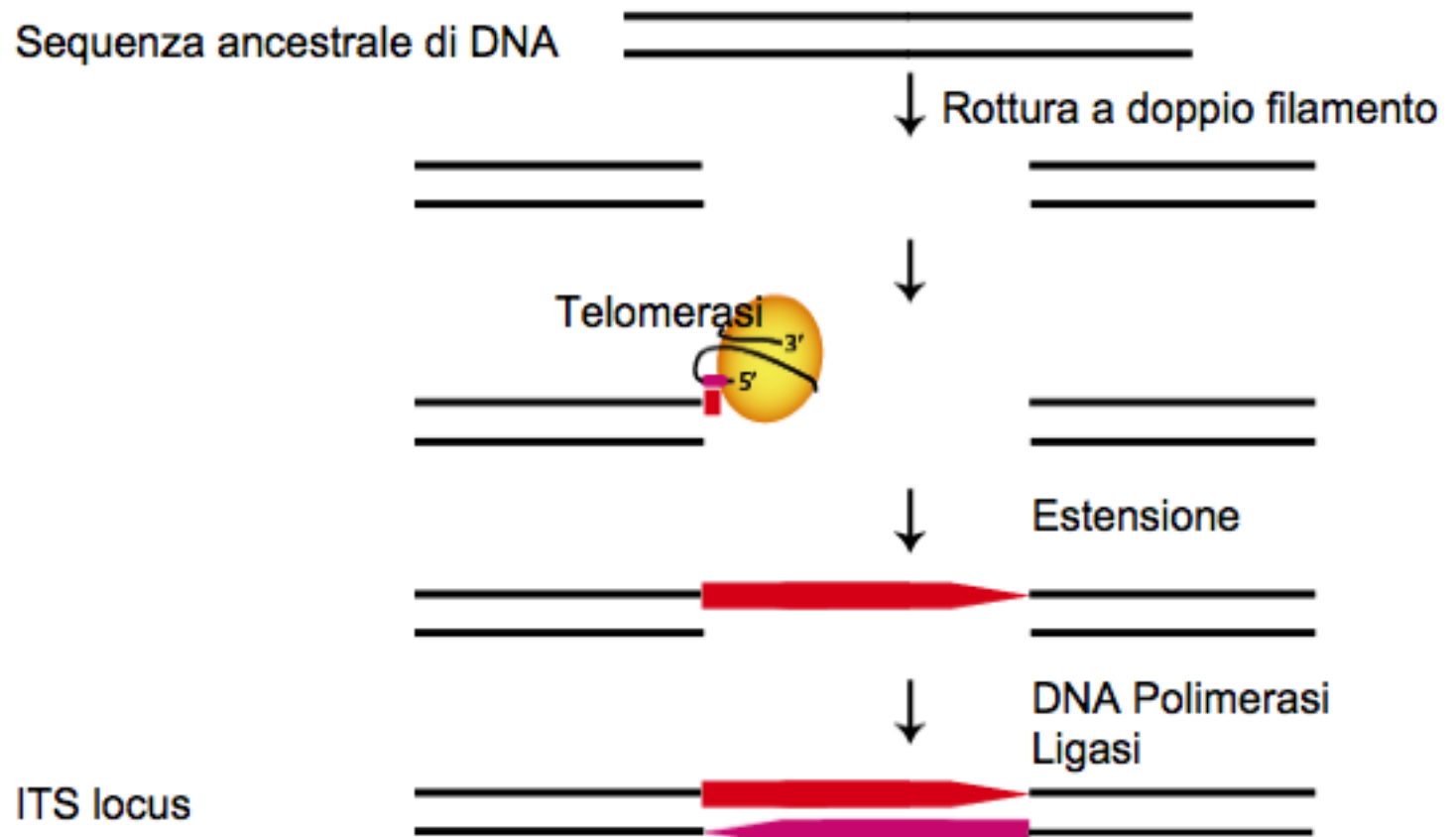
I promotori con isole CpG di TERRA sono localizzati immediatamente a monte del sito d'inizio trascrizione di TERRA a diversi subtelomeri e sono legati dalla RNAPII *in vivo*;

L'attività trascrizionale dei promotori di TERRA è regolata dalla metilazione delle citosine dei dinucleotidi CpG

Nergadze S.G., Farnung B.O., Wischnewski H., Khoriauli L., Vitelli V., Chawla R., Giulotto E. and C.M. Azzalin (2009) **CpG-island promoters drive transcription of human telomeric repeat-containing RNA** (submitted)

Come?

Le ITS sono inserite nel genoma dalla telomerasi durante la riparazione di rotture a doppio filamento del DNA



Ruiz-Herrera A, Nergadze SG, Santagostino M, Giulotto E. (2008) *Cytogenet. Genome Res.* 122:219-228
Nergadze SG, Santagostino M, Salzano A, Mondello C, Giulotto E. (2007) *Genome Biology.* 8, R260
Nergadze SG, Rocchi M, Azzalin CM, Mondello C, Giulotto E. (2004) *Genome Res.* 14:1704-1710
Azzalin CM, Nergadze SG, Giulotto E. (2001) *Chromosoma* 110:75-82

Trascrizione dei **telomeri**
+
Trascrizione dei **telomeri interstiziali** } = **TERRA**

Analisi funzionale dell'amplificazione genica in cellule geneticamente modificate di uomo e criceto cinese

L'amplificazione genica è un aumento del numero di copie di una regione ristretta di un cromosoma

L'amplificazione genica è un meccanismo chiave per l'attivazione dei oncogeni e insorgenza della resistenza ai farmaci nelle cellule tumorali

L'amplificazione genica coinvolge la generazione e unione di rotture a doppio filamento del DNA (DSB)

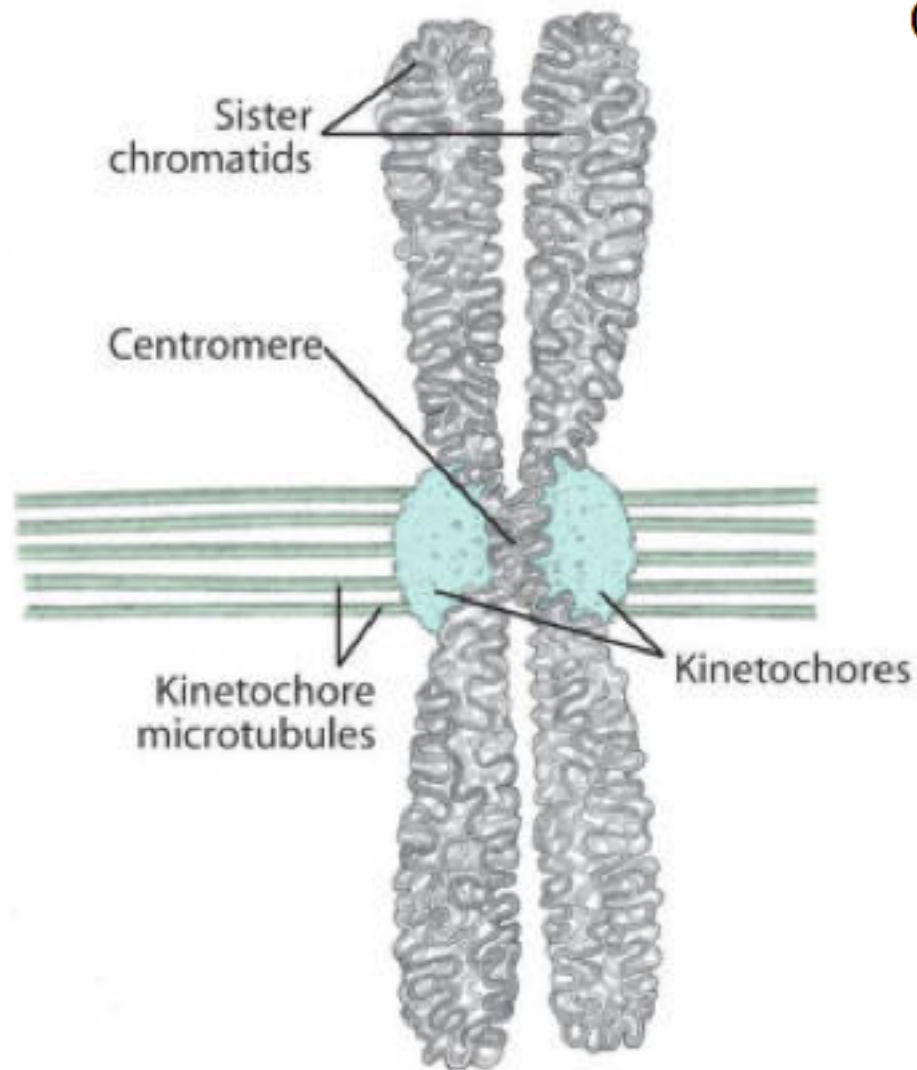
Una collezione di linee cellulari con mutazioni in diverse proteine coinvolte nella riparazione del DNA è stata utilizzata come modello per lo studio dell'amplificazione genica

L'organizzazione delle regioni amplificate dipende dal background genetico. La frequenza dell'amplificazione genica è aumentata un cellule difettive nei meccanismi di riparazione del DNA

•Salzano A, Kochiashvili N, Nergadze S, Khorauli L, Smirnova A, Ruiz-Herrera A, Mondello C, Giulotto E. (2009). Enhanced gene amplification in human cells knocked down for DNA-PKcs. *DNA REPAIR* (Amst). 8:19-28

•Rebuzzini P, Martinelli P, Blasco M, Giulotto E, Mondello C. (2007). Inhibition of gene amplification in telomerase deficient immortalized mouse embryonic fibroblasts. *Carcinogenesis*. 28:553-9

Caratterizzazione molecolare di un neocentromero evolutivo di *E. caballus*

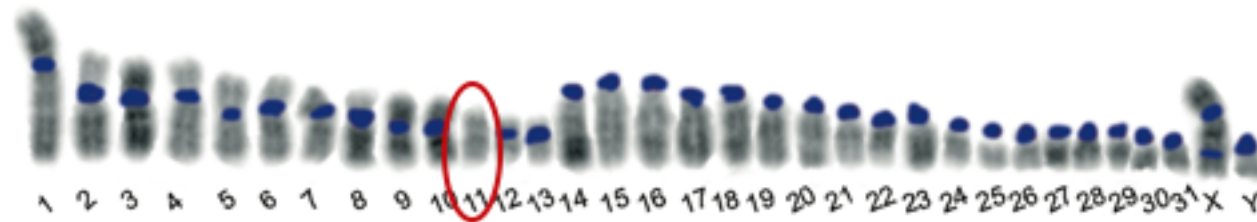


CENTROMERO

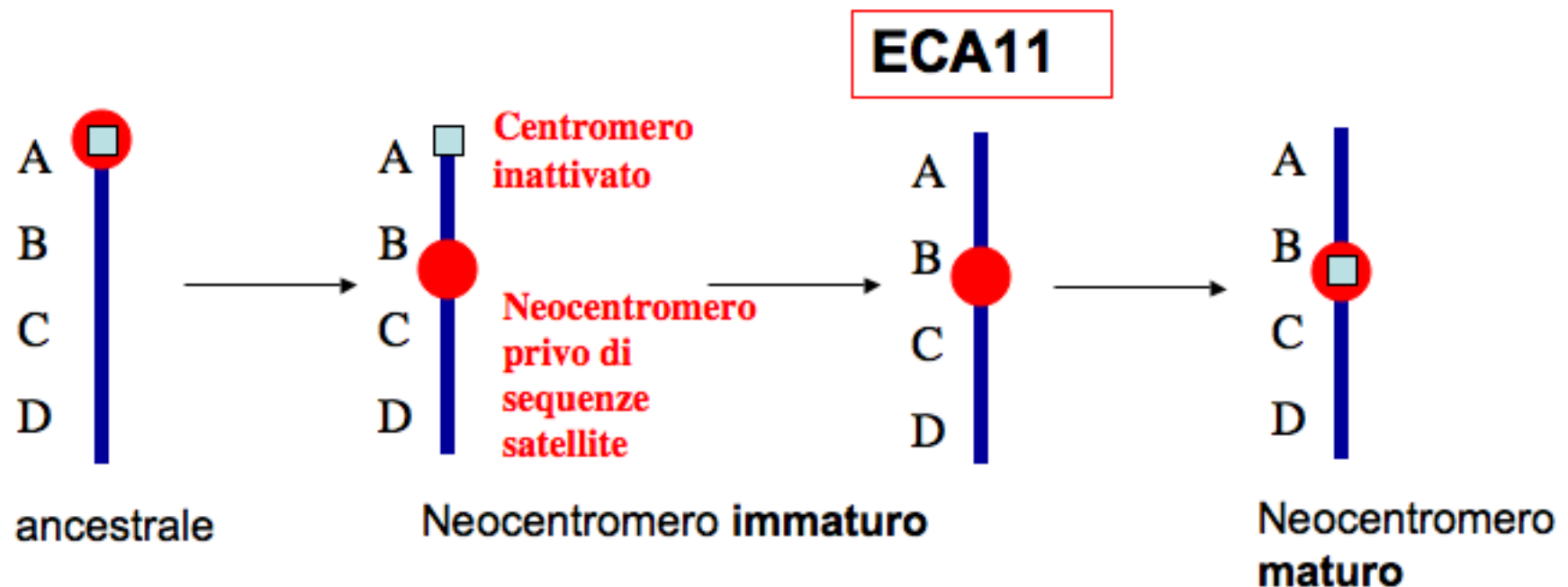
- Costrizione primaria dei cromosomi, essenziale per la segregazione dei cromatidi fratelli
- Componente a DNA (**DNA satellite**)
- Componente proteica o cinetocoro per il legame con il fuso mitotico (**CENP-A**, **CENP-B**, **CENP-C**...)

Analisi dell'evoluzione delle sequenze satellite in varie specie del genere *Equus*

La funzione centromerica non è sempre associata alla presenza di DNA satellite



Caratterizzazione molecolare del neocentromero evolutivo di *E. caballus*



Il centromero di ECA11:

è una regione in cui NON sono presenti nè DNA satellite, nè particolari caratteristiche o geni

è stabile e funzionale in tutti i cavalli ma non contiene DNA satellite;

è il primo esempio di centromero "immaturo" che sostiene la teoria secondo cui il cavallo è una specie in rapida evoluzione;

è una regione altamente conservata nei mammiferi ma il cavallo è l'unica specie in cui il centromero è presente, in accordo con l'ipotesi secondo cui la funzione centromerica non è correlata con la sequenza del DNA;

rappresenta un buon modello per gli studi futuri sui fattori epigenetici responsabili per la funzione centromerica.

Piras M, Nergadze SG, Poletto V, Cerutti F, OA Ryder OA, Leeb T, Raimondi E, Giulotto E. (2009) **Phylogeny of horse chromosome 5 in the genus *Equus* and centromere repositioning.** *CGR* (in press)

Wade CM, Giulotto E, Sigurdsson S, Zoli M, Gnerre S, ..., Magnani E, ..., Nergadze SG, ..., Piras MF, Raudsepp T, Rocchi M et al. (2009) **Genome sequence, comparative analysis and population genetics of the domestic horse (*Equus caballus*)** (submitted)

Piras MF, Nergadze SG, Magnani E, Bertoni L, Attolini C, Raimondi E, Giulotto E. (2009) **Uncoupling of satellite DNA and centromeric function in the genus *Equus*** (submitted)

Carbone L, Nergadze SG, Magnani E, Misceo D, Cardone MF, Roberto R, Bertoni L, Attolini C, Piras MF, de Jong P, Raudsepp T, Chowdhary BP, Gu_鬃in G, Archidiacono N, Rocchi M, Giulotto E. (2006) **Evolutionary movement of centromeres in horse, donkey, and zebra.** *Genomics*. 87:777-782

Dipartimento di Genetica e Microbiologia
Laboratorio di Biologia Molecolare e Cellulare

Responsabile Prof. Elena Giulotto

Studenti

Valerio Vitelli
Manuel Lupotto
Giulia Biffi
Valentina Poletto
Federico Cerutti

Post-docs

Lela Khoriauli
Alexandra Smirnova
Francesca Piras
Solomon Nergadze

Dottorandi

Marco Santagostino
Pamela Vidale

Strutturati

Carmen Attalini
Livia Bertoni

Collaborations

Claus Azzalin (BC, Zurich) Joachim Lingner (ISREC, Epalinges) **TERRA**
Clear Wade, Sante Gnerre, Kerstin Lindblad-Toh (Broad Institute, Cambridge, MA)
Giuliano della Valle (Università di Bologna, Italia)
Mariano Rocchi (Università di Bari, Italia)
Tosso Leeb (University of Berne, Switzerland)
Elena Raimondi (Università di Pavia)
Antonio Torroni (Università di Pavia)
Aurora Ruiz-Herrera (Universitat Autònoma de Barcelona, Spain) **Gene amplification**
Silvia Garagna (Università di Pavia) **Evolution of genus Mus**
Chiara Mondello (CNR, Pavia) **ITS**

