

# Genetica Molecolare

Anno accademico 2019/2020

## Lezione 24

### I Telomeri

I telomeri formano le terminazioni dei cromosomi lineari eucariotici.

I telomeri sono strutture nucleoproteiche, composte quindi da DNA e proteine. Il DNA che lo compone è una struttura ricca di timine e guanine. La sequenza tipica nell'uomo è TTAGGG, ripetuta molte volte. La sequenza nel lievito è TG1-3 (con G ripetuta da 1 a 3 volte). La sequenza ripetuta dipende dall'azione della proteina che replica i telomeri, che è la **telomerasi**.

Il telomero termina con una estremità 3' protruding, detta G-strand o G-tail. La complementare terminazione 5' è detta C-strand.

La terminazione telomerica è preceduta dalla regione subtelomerica, che ha all'interno ripetizioni della sequenza telomerica. La terminazione telomerica varia in ogni organismo, ed ha un range di lunghezza fisiologico caratteristico di ogni organismo.

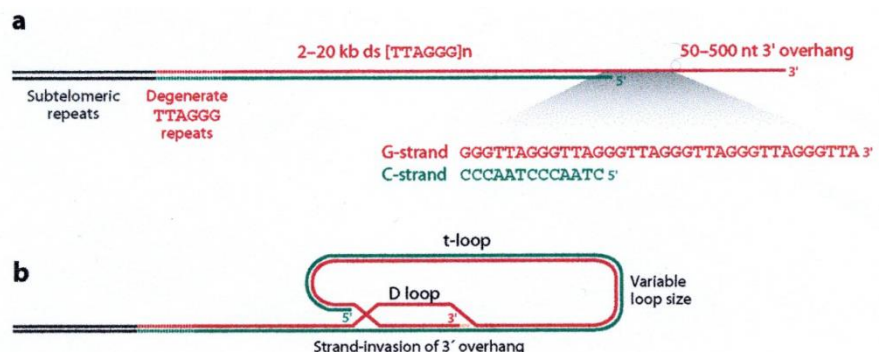
Nel lievito la porzione di dsDNA del telomero è di circa 200-300bp, mentre l'estremità 3' protruding è di circa 12-14 nucleotidi, ed arriva ad oltre 25 nucleotidi durante la fase S.

Nell'uomo la porzione di dsDNA del telomero è lunga circa 5-15kb, mentre l'estremità 3' protruding è maggiore di 100kb.

Quando si parla di lunghezza del telomero si intende generalmente la lunghezza della regione di dsDNA del telomero, che è quella più facilmente misurabile.

### Struttura del telomero

Si è visto che il DNA alle terminazioni telomeriche dell'uomo assume una conformazione caratteristica, che si chiama **t-loop**. Nella struttura t-loop il ssDNA invade la regione D-loop e vi si annila. I t-loop sono stati osservati in microscopia elettronica, ma non è chiaro se tutti i cromosomi umani formano struttura t-loop.



Questa particolare struttura protegge il DNA telomerico dall'attacco di nucleasi.

Nel lievito si pensa che i t-loop non si formino, perché per formare il t-loop è necessario che il ssDNA protruding sia abbastanza lungo da poter essere stabilmente appaiato all'elica complementare in seguito all'invasione del dsDNA telomerico. Si ritiene si formino altre strutture di terminazione nel lievito.

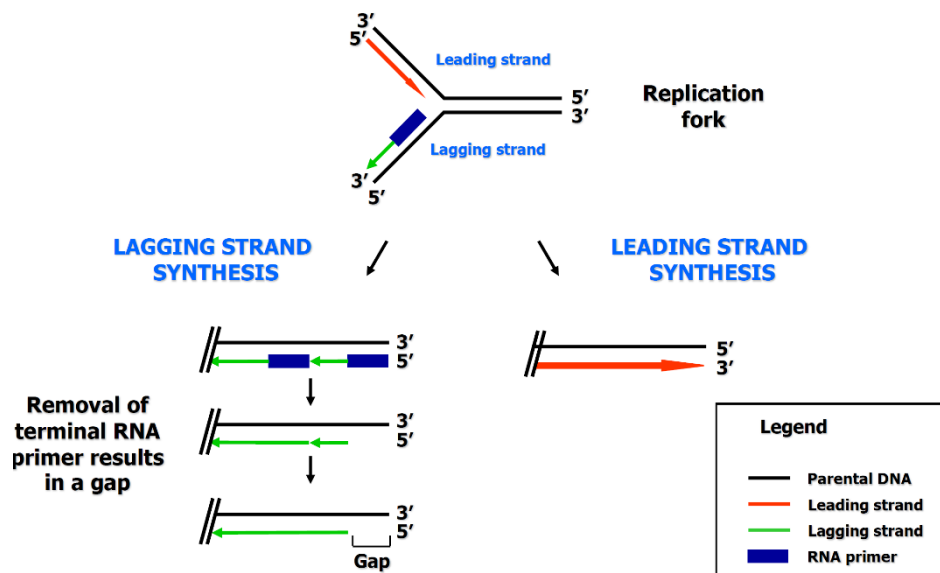
## End replication problem

### L'end replication problem

si ha quando la forza replicativa arriva alla terminazione. Sulla leading strand non c'è alcun problema a replicare, perché il complesso di replicazione arriva fino alla fine del filamento.

Sulla lagging strand invece si ha un iniziale priming, che viene poi allungato dalla DNA polimerasi. Anche se il priming da parte della RNA primasi viene fatto esattamente

alla terminazione, dopo l'allungamento da parte della DNA polimerasi il primer ad RNA viene rimosso e si genera un gap, che non può essere riempito.



Se consideriamo che ad ogni ciclo cellulare si ha la replicazione di ogni cromosoma diventa evidente che, se non ci fosse un meccanismo per riempire il gap alla terminazione della lagging strand, si incorrerebbe nella perdita di una porzione di DNA terminale ad ogni ciclo.

Questo problema è stato risolto dalla scoperta di un enzima che è in grado di replicare le terminazioni del DNA. Questo enzima è la **telomerasi**, scoperta da Blackburn e Gall nel 1978.

Blackburn e Szostak hanno invece scoperto il DNA telomerico è composto da sequenze ripetute in tandem.

Questo succede in tutti gli organismi, tranne che nella *Drosophila*. La *Drosophila* non ha telomerasi, ed i suoi cromosomi terminano con una sequenza random di DNA. La sequenza specifica presente nei cromosomi umani dipende dall'enzima telomerasi.

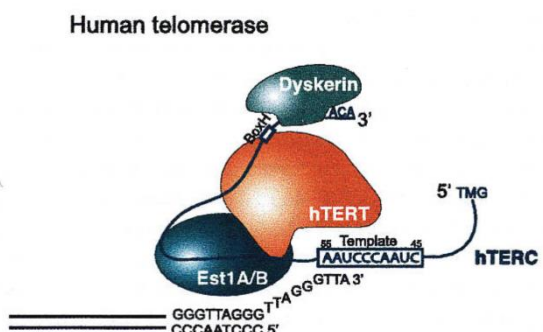
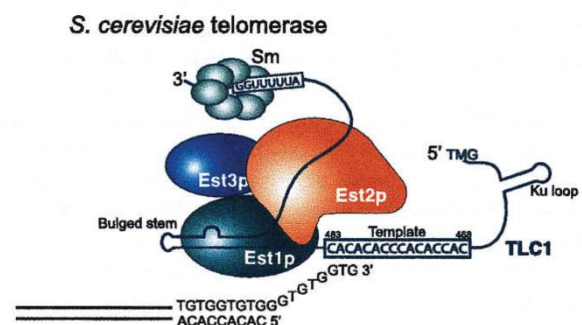
## Telomerasi

La telomerasi è una trascrittasi inversa specializzata nella replicazione dei telomeri, che usa una molecola di RNA dedicata che fa parte dell'oloenzima.

Nel lievito la molecola di RNA specifica si chiama TLC1, mentre nell'uomo si chiama hTerc. Questo filamento di RNA viene trascritto a partire dal suo gene.

La porzione proteica è composta nel lievito dalle tre subunità Est1p, Est2p ed Est3p, dove EST sta per *Even Short Telomer*, perché identificate da mutanti che mostravano telomeri accorciati.

- Est2p ha l'attività di trascrittasi inversa.
- Est1p media il legame tra Est2p e DNA telomerico.



- Est3p ha probabilmente un effetto regolatorio.

Basta rimuovere una di queste tre subunità della telomerasi per avere perdita di attività dell'enzima.

Nell'uomo l'enzima è più complesso rispetto al lievito. La parte con attività di trascrittasi inversa è hTERT, e ci sono anche delle proteine associate, come *Dyskerin* ed *EstA/B*.

### Funzionamento della telomerasi

La molecola di RNA dedicata della telomerasi si appaia alla regione 3' protruding del telomero. L'enzima telomerasi aggiunge quindi nucleotidi all'estremità 3' protruding usando come stampo l'RNA, allungando la G-strand. La sequenza dei telomeri varia quindi tra gli organismi perché dipende dall'RNA template usato per l'allungamento.

Successivamente all'allungamento della G-strand da parte della telomerasi si ha la sintesi della porzione complementare. Questa operazione è svolta dal complesso Pol  $\alpha$  – Primasi, con la primasi che fa un primer sul ssDNA G-tail, che viene poi allungato da Pol  $\alpha$ . Il complesso Pol  $\alpha$  – Primasi e la telomerasi agiscono in contemporanea.

### Senescenza

La lunghezza dei telomeri è in qualche modo direttamente connessa all'invecchiamento. Questa scoperta è stata fatta in un ceppo di lievito in cui è stato rimosso il gene *tlc1*, che codifica per l'RNA stampo, ed in quello in cui è stato rimosso il gene *est1* che codifica per una subunità della telomerasi.

Si sono fatti replicare in piastre separate un ceppo WT, un ceppo *tlc1Δ* ed un ceppo *est1Δ*. Si è visto che il ceppo WT continuava a replicare dopo 75 generazioni. I ceppi *tlc1Δ* ed *est1Δ* mostravano invece una riduzione della capacità di replicazione già dopo 50 cicli.

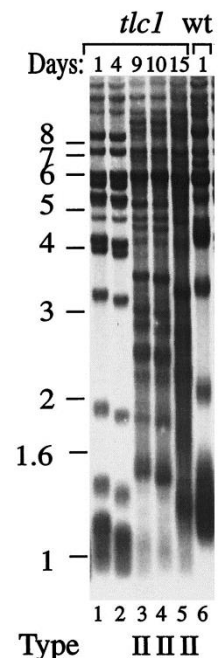
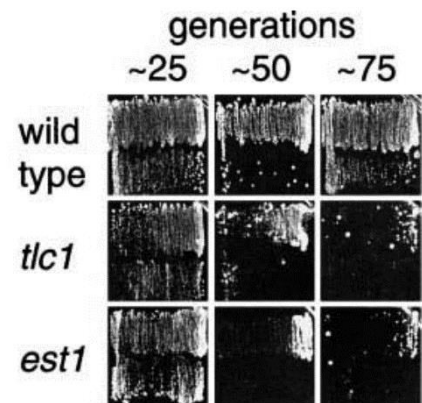
La mancanza della telomerasi causa un invecchiamento precoce delle cellule rispetto al ceppo WT, detto senescenza.

Nelle piastre *tlc1Δ* e *est1Δ* visualizzate dopo 75 cicli si osserva che molte cellule non sopravvivono, però si evidenzia la comparsa di colonie che riescono a replicare. Queste colonie survivor (sopravviventi) si dividono e riacquisiscono la capacità di allungare i telomeri.

Al southern blot è possibile studiare i telomeri. La porzione dsDNA telomerica si evidenzia nella parte più bassa del gel elettroforetico (cioè la parte di DNA che compie più distanza nell'elettroforesi), nella banda 1-1.6kb del ceppo WT.

Nel ceppo *tlc1Δ* invece il DNA telomerico si evidenzia come più corto (più veloce all'elettroforesi) già dopo un giorno. È ancora diminuito dopo 4 giorni e quasi scomparso nei giorni dopo il 9. Questo perché l'assenza della telomerasi causa il progressivo accorciamento del telomero ad ogni ciclo cellulare. Inoltre venendo a mancare in seguito le sequenze telomeriche non si potranno formare strutture che proteggono le estremità del DNA (tipo t-loop), per cui il DNA sarà più suscettibile all'attacco delle nucleasi.

Nei mutanti survivor si ha in qualche modo la ripresa dell'allungamento dei telomeri.



È stato dimostrato che il meccanismo che porta alla riattivazione dell'allungamento dei telomeri nei survivor è il processo di ricombinazione, sia nel lievito che nell'uomo, in modo telomerasi indipendente. Questo meccanismo, chiamato ALT (Alternative Lengthening of Telomers), è molto studiato perché importante nella patologia oncologica.

La maggior parte delle cellule umane non esprime telomerasi, per cui le terminazioni cromosomiche si accorciano e le cellule progressivamente invecchiano. Nel tumore le cellule neoplastiche hanno una aumentata capacità replicativa, che si presenta per la riattivazione della telomerasi o per la comparsa del meccanismo ALT; in ogni caso la cellula sfugge alla senescenza allungando i telomeri.

Capire il meccanismo ALT è importante, perché questo potrebbe rappresentare un bersaglio importante nella patologia oncologica.

## Discheratosi congenita

La discheratosi congenita è una malattia genetica causata da mutazioni su due geni, e si presenta in due forme:

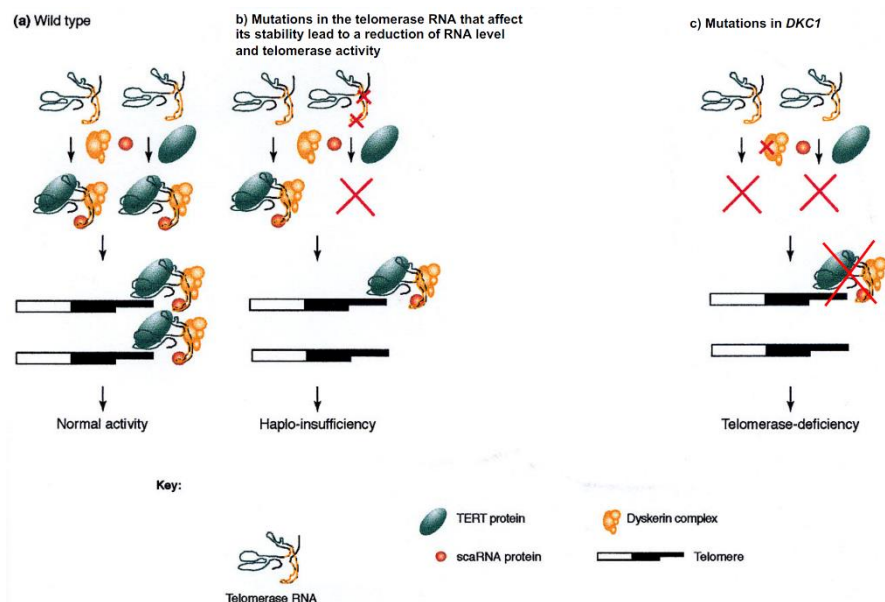
- La malattia è autosomica dominante per aploinsufficienza quando causata da mutazioni in *TERC*, che è la componente a RNA della telomerasi.
- La discheratosi è recessiva X-linked quando causata da mutazioni del gene *DKC1*, che codifica per la Diskerina.

Il fenotipo del paziente con discheratosi congenita si presenta con anormale pigmentazione della pelle, distrofia delle unghie, anemia aplastica, leucoplachia, aumento del rischio di tumore e invecchiamento prematuro.

L'anemia aplastica si presenta perché le cellule staminali ematopoietiche presenti nel midollo osseo sono cellule ad alto tasso di replicazione, che danno luogo alla porzione corpuscolata del sangue. Il mancato allungamento dei telomeri che causa la Discheratosi congenita porta ad una precoce senescenza delle cellule staminali ematopoietiche, che inficia la produzione delle cellule del sangue.

La diskarina è una proteina che lega *TERC* e partecipa alla formazione dell'oloenzima telomerasi. La diskarina lega anche piccole molecole di RNA (snoRNA) ed è coinvolta nella maturazione delle molecole di rRNA. Mutazioni nel gene della Diskarina alterano l'interazione della proteina con il complesso telomerasi.

Mutazioni sul gene della diskarina sono recessive perché basta un solo allele funzionante per supplire alla funzione della proteina.



Mutazioni in TERC sono invece dominanti per via dell'aploinsufficienza, per cui un solo gene TERC WT è incapace di fornire una quantità di prodotto sufficiente ad assicurare la normale funzione di allungamento dei telomeri.

Una mutazione si dice dominante quando il prodotto del gene mutato interferisce con la proteina WT, riducendone l'attività di oltre il 50%.

Tra mutazione dominante e aploinsufficiente, la differenza è nel processo molecolare alla base. Nella mutazione dominante si ha una mutazione con guadagno di funzione che interferisce con il prodotto del gene WT. Nell'aploinsufficienza il singolo gene WT non è in grado di sopperire alla mancanza dell'allele mutato.

La discheratosi congenita autosomica dominante mostra anticipazione, con comparsa precoce dei sintomi che si fanno più severi generazione dopo generazione.

### **Regolazione della telomerasi**

La telomerasi richiede la formazione di ssDNA 3' protruding alla estremità dei telomeri, perché necessaria all'appaiamento del filamento di RNA TERC. La telomerasi in *S.cerevisiae* funziona solo nelle fasi S e G2 del ciclo cellulare, ed infatti la lunghezza della G-tail in questo organismo varia durante le fasi del ciclo cellulare, e la sua massima lunghezza la raggiunge in fase S-G2, permettendo alla telomerasi di agire sui telomeri.

La formazione della coda G-tail è sotto il controllo dei complessi Clb e Cdk1, la cui attività chinasi è richiesta per generare la G-tail. Questi complessi proteici sono presenti solo in S-G2, quindi la G-tail è presente solo in questa fase, e permette alla telomerasi di svolgere la sua attività di allungamento dei telomeri.

Questa regolazione è stata studiata molto bene nel lievito grazie al fatto che è possibile bloccare il ciclo cellulare in diverse fasi e studiare l'attività della telomerasi.

### *Generazione della G-tail*

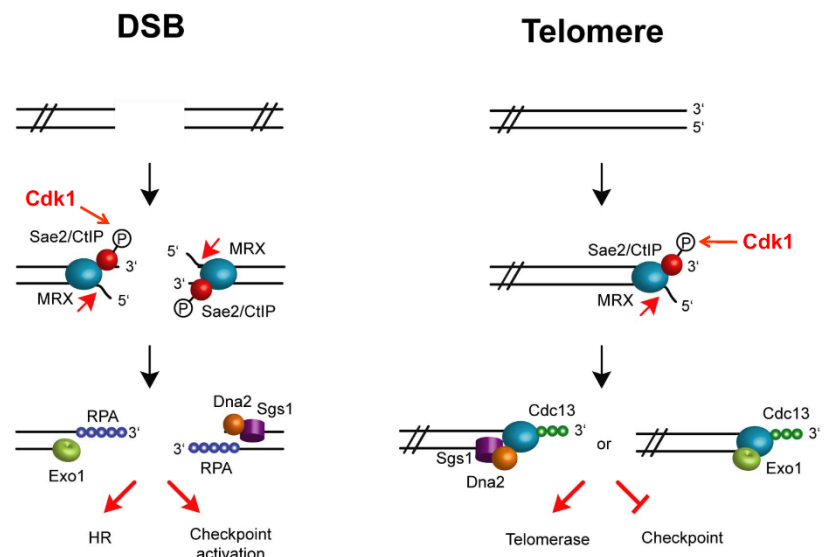
Quando la forza replicativa arriva all'estremità telomerica la leading strand viene replicata fino alla fine. La lagging strand, che è generata attraverso la formazione di frammenti di okazaki a partire da primers a RNA prodotti dalla RNA primasi, ha sempre un gap alla fine, dato dal fatto il primer a RNA viene rimosso; quindi si avrà già la formazione di ssDNA 3' protruding.

La replicazione della leading strand arriva fino alla fine del telomero, quindi l'estremità 3' protruding deve essere generata in qualche modo. Il meccanismo che genera il ssDNA è molto simile al meccanismo di resection che genera ssDNA alla estremità dei DSBs. Effettivamente la terminazione del DNA è una terminazione simile a quella che si ha al sito della double strand break.

Questo meccanismo funziona sia sull'estremità lagging che su quella leading del cromosoma.

Si è visto che la generazione di ssDNA sui telomeri dipende dall'attività del complesso MRX, che presumibilmente funziona effettuando un taglio endonucleolitico. Subentrano poi le nucleasi Exo1 e Dna2. Si genera così l'estremità 3' protruding su cui agisce la telomerasi.

La differenza tra il sistema di risposta ai DSBs ed il sistema che genera la G-tail è che il ssDNA nei DSBs è ricoperto dal complesso a tre subunità RPA, mentre al telomero il ssDNA è legato al complesso CST, che è composto da Cdc13, Stn1 e Ten1. Questo è un complesso molto conservato, presente sia nel lievito che nell'uomo, affine alle sequenze telomeriche.



La telomerasi funziona soltanto in S-G2 perché il complesso MRX richiede la proteina Sae2/CtlP, che attiva la funzionalità nucleasica di Mre11 solo se viene fosforilata da Clb-Cdk1. Clb-Cdk1 è attiva solo in fase S-G2, per cui la telomerasi funziona solo in questa fase.

Al DSB l'attività di Exo1 e Dna2 è poco regolata, in quanto rimuovono anche tratti molto lunghi di DNA lasciando una estremità 3' molto lunga, utile a fare strand invasion.

Al telomero l'azione delle nucleasi è regolata, e generano in ssDNA abbastanza corto.

Un regolatore della telomerasi è la resection, in quanto la generazione di ssDNA è necessaria. L'altro meccanismo di regolazione dell'azione della telomerasi necessita di MRX/MRN e Tel1/ATM.

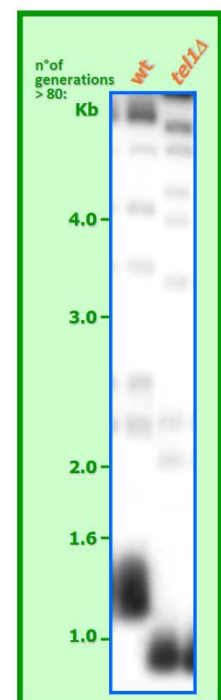
La mancanza di Tel1 si è visto essere causa di accorciamento del telomero. Allo stesso modo la mancanza di uno dei componenti di MRX causa accorciamento dei telomeri.

Tel1 ed MRX agiscono assieme, in quanto MRX è richiesto per caricare Tel1 sul DNA telomerico. Tel1 fosforila dei bersagli non conosciuti, attivando la telomerasi.

È possibile realizzare un esperimento di southern blot in cui si analizza DNA genomico da un ceppo di lievito WT e da uno *tel1Δ*. Si taglia il DNA con enzimi di restrizione, si carica su gel, si trasferisce su filtro e si ibrida con una sonda CA, che permette di identificare le estremità telomeriche. Si evidenzia che il ceppo *tel1Δ* ha telomeri molto più corti del ceppo WT.

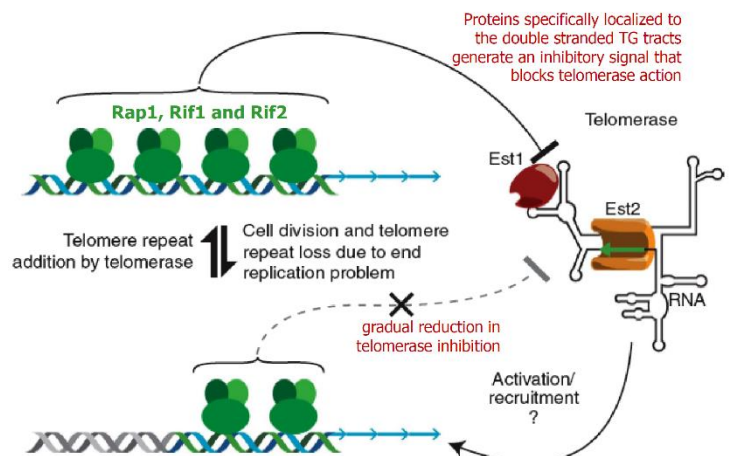
### Modello del funzionamento della telomerasi

All'estremità telomerica MRX carica Tel1 sul DNA. Tel1 funziona permettendo il caricamento della telomerasi su DNA telomerico. Si ritiene che Tel1 usi la sua capacità di fosforilazione per permettere il caricamento della telomerasi, perché mutanti Tel1kd (kinase dead) mostrano una non corretta attività della telomerasi.





Il complesso Pol  $\alpha$  – primasi effettua la sintesi dell'estremità telomerica su stampo dell'RNA della telomerasi. Si è visto che se si muta il complesso Pol  $\alpha$  – primasi si assiste ad un overallungamento, per cui si ritiene che il complesso Pol  $\alpha$  – primasi legato al DNA inibisca l'azione della telomerasi.



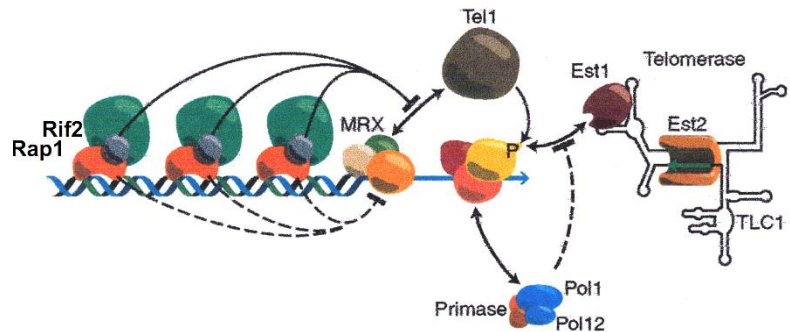
causa la formazione di dsDNA telomerico, che a sua volta viene legato dal complesso shelterin, che inibisce l'attività della telomerasi. Si viene quindi a formare un equilibrio tra allungamento e accorciamento del telomero, che dipende dalla quantità di dsDNA che lega shelterin.

Si è visto che la rimozione di una delle subunità di shelterin causa l'allungamento dei telomeri.

### Funzionamento di shelterin

Il complesso MRX che lega l'estremità telomerica carica Tel1 sul DNA. Tel1 promuove il reclutamento della telomerasi mediante fosforilazione.

Si è visto che la proteina Rif2 del complesso shelterin inibisce l'interazione tra MRX e Tel1, legando Tel1 sullo stesso sito legato dalla porzione Xrs2 di MRX. Rif2 compete con MRX per il legame a Tel1. Se c'è tanto Rif2 sul dsDNA telomerico Tel1 difficilmente legherà MRX.



Si sa che Rif1 funziona in modo diverso da Rif2, perché se si leva una delle due proteine tra Rif1 e Rif2 si vede un allungamento dei telomeri, e se si levano entrambe si assiste ad un ancora maggiore allungamento. Le due proteine agiscono quindi su due pathway diverse.

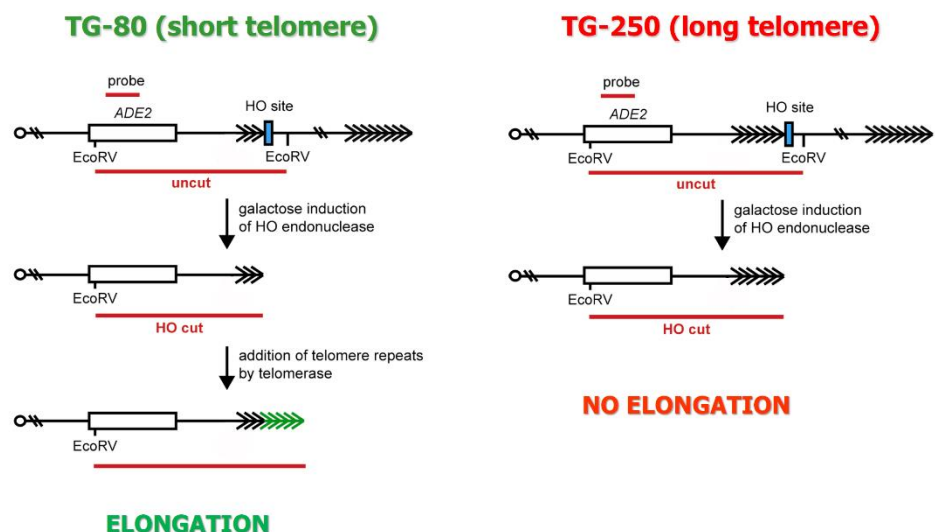
### De novo telomere elongation assay

Si può costruire un ceppo di lievito in cui il sito di taglio riconosciuto da HO viene inserito in una determinata regione di genoma, e vicino ad esso vengono inserite sequenze TG, come quelle telomeriche.

Si fa l'esperimento con due ceppi, uno in cui la sequenza TG è di 80 ripetizioni, ed un altro in cui la sequenza TG è lunga 250 ripetizioni. Queste sequenze simulano un telomero corto ed un telomero lungo.

Si stimola l'induzione di HO mediante galattosio e si assiste al taglio nucleolitico sul sito bersaglio, che dà luogo ad un cromosoma de novo.

Si è dimostrato che nel ceppo in cui era stata inserita una sequenza TG da 80 ripetizioni si aveva allungamento del nuovo telomero, mentre nel ceppo da 250 ripetizioni TG non si assisteva ad allungamento del telomero.

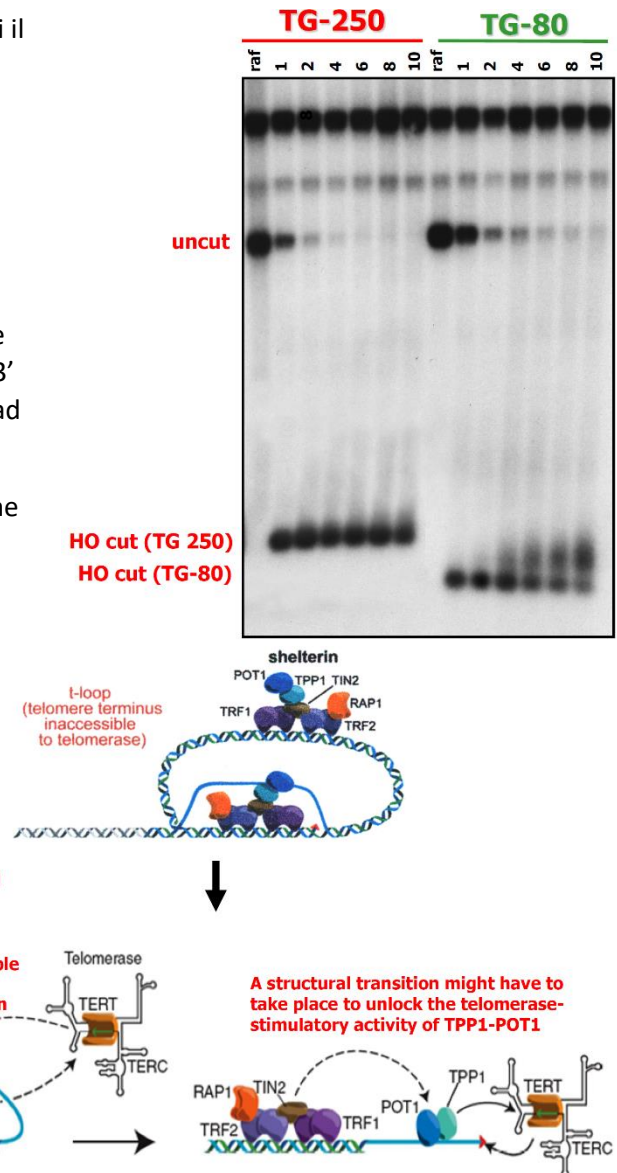




Questo è evidenziabile mediante un Southern blot in cui il DNA viene ibridato con una sonda complementare alla sequenza telomerica. Nel campione derivato dal ceppo TG-80 si vede che col passare del tempo la banda telomerica rallenta la sua corsa.

Nell'uomo non è chiaro il funzionamento del complesso shelterin. Si è visto che la formazione del t-loop dipende dal complesso shelterin. Il t-loop nasconde il filamento 3' protrudendo del telomero, e potrebbe essere sufficiente ad impedire l'attivazione della telomerasi.

Si è visto che ci potrebbe essere una seconda regolazione mediata da POT1. La proteina POT1, legata al ssDNA potrebbe inibire la telomerasi.



## End protection problem

Quando c'è un DSB nel DNA la cellula attiva il checkpoint di danno cellulare ed i meccanismi di risposta al danno, quali NHEJ ed HR.

La terminazione naturale dei cromosomi eucariotici è dal punto di vista molecolare un DSB. Questa regione può quindi potenzialmente attivare tutte le risposte che la cellula attiva in seguito a DSBs, ma questa evenienza non deve verificarsi. A questo scopo il DNA telomerico deve essere protetto dall'attivare la risposta al danno, in quanto altrimenti si avrebbero arrangiamenti cromosomici anomali, con i telomeri che andrebbero incontro a NHEJ o ricombinazione omologa.

Si è studiato che quando in *S. pombe* si rimuove il meccanismo di protezione delle estremità telomeriche si ha la circolarizzazione dei cromosomi normalmente lineari del lievito, in quanto le estremità cromosomiche sono oggetto di riparazione del DNA. *S. pombe* usa molto NHEJ per riparare, per cui si assiste alla circolarizzazione.

La ricombinazione tra estremità telomeriche di cromosomi diversi si è evidenziata anche in cellule umane in cui era stato rimosso ATM.

Le risposte che funzionano al DSB ma che devono essere bloccate al telomero sono:

- Attivazione di ATM
- Attivazione di ATR
- Ricombinazione omologa
- Non-homologous end joining

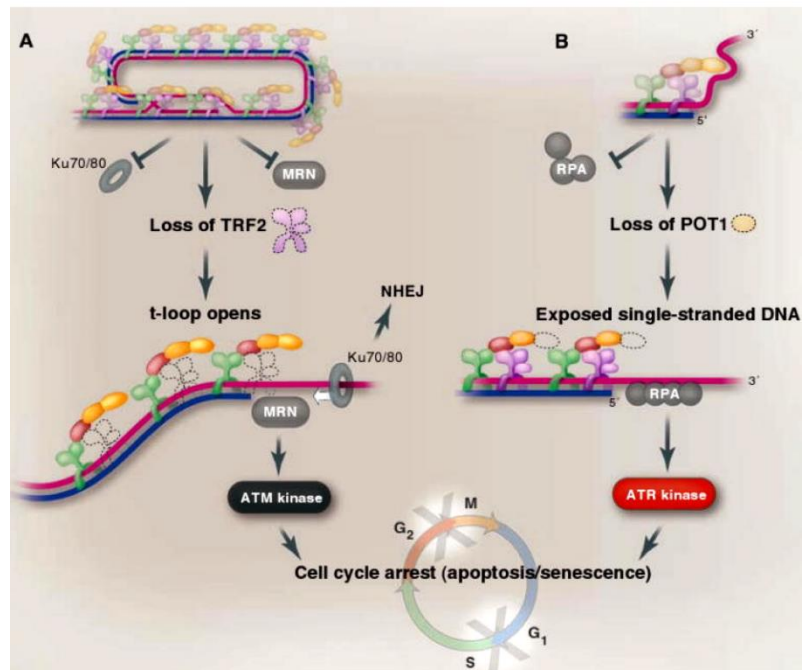
La soluzione è il complesso shelterin. Questo complesso si lega al DNA telomerico e promuove la formazione del t-loop, che nasconde l'estremità telomerica all'azione del complesso di riparazione del DNA.

Ciascuna delle subunità di shelterin inibisce uno dei meccanismi di risposta al DSB.

TRF2 inibisce la chinasi ATM.

POT1 inibisce la chinasi ATR. POT1 lega il ssDNA alla terminazione, e ATR si attiva riconoscendo RPA legata al ssDNA.

## How TRF2 and POT1 hide the end



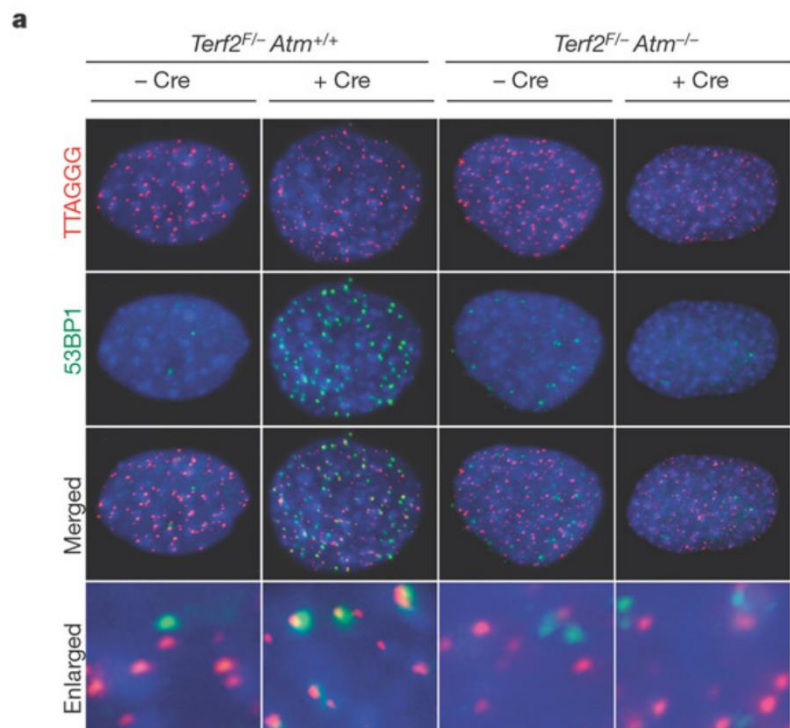
Questo tipo di inibizione da parte del complesso shelterin è stata studiata nel lievito. Sono stati creati due ceppi:

Un ceppo  $Terf2^{F/-} Atm^{+/+}$ , che ha  $Terf2$  (TRF2) con un allele rimosso ed un allele sotto il controllo di Cre, mentre entrambi gli alleli  $Atm$  sono funzionanti.

Un secondo ceppo è  $Terf2^{F/-} Atm^{-/-}$ , in cui  $Atm$  è stato rimosso e  $Terf2$  ha un allele rimosso ed un allele sotto il controllo di Cre.

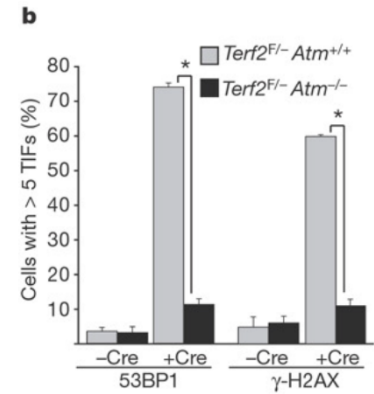
Nel primo ceppo  $Atm^{+/+}$  si vede che quando Cre non è attivo si evidenziano i telomeri ma non si ha attivazione del checkpoint da danno, misurato identificando la proteina 53BP1.

Quando Cre è attivo invece, e quindi anche il rimanente allele di  $Terf2$  è rimosso, si vede una evidente risposta al danno, identificata in prossimità della sequenza telomerica. Ciò significa che le estremità telomeriche vengono riconosciute come DSBs in assenza di  $Trf2$ , con attivazione del checkpoint che dipende da 53BP1.



Per capire da cosa dipende l'attivazione del checkpoint si rifà lo stesso esperimento nel ceppo  $Atm^{-/-}$ . Senza induzione di Cre si ha un allele  $Trf2$  funzionante, quindi i telomeri sono protetti e non si ha attivazione di checkpoint. Quando si induce Cre, che elimina l'ultimo allele di  $Trf2$  in cellule senza  $Atm$ , si ha la perdita dei foci di attivazione di 53BP1, quindi non si ha attivazione del checkpoint. Il checkpoint dipende quindi da  $Atm$ .

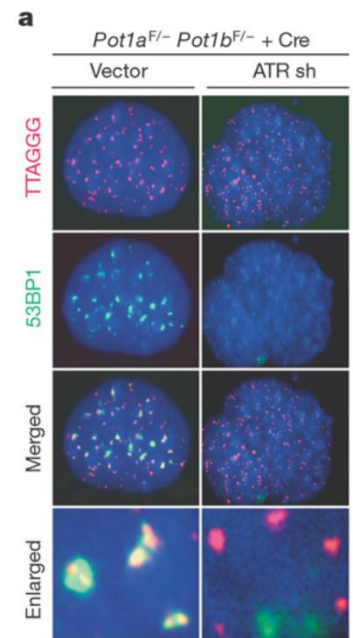
Allo stesso modo si rileva un aumento nella quantità di istone fosforilato  $\gamma$ -H2AX nel ceppo  $Atm^{+/+}$  e  $Terf2^{F/-}$  in cui è stato indotto Cre (quindi entrambi gli alleli  $Terf2$  rimossi), assieme all'aumento di 53BP1, ad indicare attivazione del checkpoint. Ceppi privi di  $Atm$  non attivano il checkpoint, che quindi si rivela dipendente da  $Atm$ .



Lo stesso esperimento è stato fatto con un ceppo in cui le proteine  $Pot1a$  e  $Pot1b$  erano sotto il controllo di Cre. Si vede che eliminando entrambi gli alleli di  $Pot1a$  e  $Pot1b$  si ha la comparsa dei foci di riparazione in prossimità dei telomeri, evidenziabile con la sovrapposizione tra la localizzazione di 53BP1 e il telomero.

Quando si silenzia il gene  $ATR$  nel ceppo  $Pot1a^{F/-} Pot1b^{F/-}$  in cui è indotto Cre, si evidenzia l'assenza di attivazione di 53BP1 a causa dell'assenza di  $ATR$ .

$Pot1$  quindi protegge le estremità telomeriche, inibendo  $ATR$ .



### Degradazione nucleolitica

L'estremità dei cromosomi deve essere protetta dalla eccessiva degradazione nucleolitica alla terminazione telomerica, in cui la estremità 3' protruding serve ad attivare la telomerasi.

La protezione dalla degradazione nucleolitica è data dal complesso shelterin. Si è visto che  $TRF2$  inibisce  $ATM$  e il NHEJ, mentre  $POT1$  inibisce sia  $ATR$  che la ricombinazione omologa HR. Anche  $RAP1$  inibisce la HR.

Nell'uomo non si sa esattamente come  $RAP1$  e  $POT1$  inibiscono la ricombinazione omologa. Potrebbero inibire l'eccessivo allungamento dell'estremità 3' protruding del telomero.

Nel lievito si è osservato che sia  $Rap1$  che  $Rif2$  inibiscono la resection e la NHEJ, mentre  $Rif1$  e  $CST$  inibiscono la resection e  $Mec1$ . Il complesso shelterin impedisce quindi sia la ricombinazione omologa che la NHEJ, oltre al processo di resection.

Il complesso shelterin quindi nasconde le estremità telomeriche e ne evita la degradazione, mantenendo i cromosomi lineari.

Per monitorare ssDNA ai telomeri si può fare un esperimento, in cui da una coltura di cellule in crescita esponenziale si estrae il DNA, si taglia con enzimi di restrizione e si carica su gel. Si effettua una elettroforesi.

Nell'immagine vediamo la comparazione tra un ceppo WT, un ceppo  $rif2\Delta$  e un ceppo  $rap1\Delta C$ .

Il DNA analizzato mediante elettroforesi senza denaturazione può essere studiato per verificare la presenza di ssDNA. Si usa una sonda marcata ricca in C, che si ibridizza alla coda G-tail ed alle zone di ssDNA ricche in G.

Il DNA in questo esperimento non si trasferisce su filtro perché è dsDNA, e non si lega bene al filtro. Il DNA viene ibridato direttamente su gel.

Sul ceppo WT non si ha segnale perché il segnale G-rich è poco presente. Come controllo si usa lo stesso campione inserito in gel denaturante e ibridato con la stessa sonda C-rich.

Sul ceppo *rif2Δ* aumenta il segnale di regioni ssDNA ricche in G, perché l'assenza di Rif2 causa un aumentato processamento delle terminazioni cromosomiche, che avranno una lunga regione di ssDNA 3' protruding.

Questo esperimento, detto *non denaturing gel hybridization* serve a capire la quantità di ssDNA al telomero, non la lunghezza del ssDNA. La corsa elettroforetica è imputabile al dsDNA.

L'elettroforesi in gel denaturante ci dà invece la lunghezza del telomero.

Il gene Rap1 non è rimosso completamente ma solo nella sua porzione C, in quanto Rap1 è un gene essenziale.

